

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

Centre de Biophysique Moléculaire

**THÈSE** présentée par :  
**Sabrina POUILLY**

soutenue le : **10 Décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biochimie

**Synthèse et évaluation du métabolisme  
d'analogues immunogènes de la  
N-acétylgalactosamine (GalNAc)**

**THÈSE dirigée par :**  
**Véronique PILLER**

Chargée de recherche au CBM, Orléans

**RAPPORTEURS :**  
**Christine Le NARVOR**  
**Assou EL BATTARI**

Chargée de recherche à l'ICMMO, Orsay  
Professeur à l'Université de Provence, Marseille

---

**JURY :**

**Olivier MARTIN**  
**Véronique PILLER**  
**Christine Le NARVOR**  
**Assou EL BATTARI**

Professeur à l'Université d'Orléans, Président du jury  
Chargée de recherche au CBM, Orléans  
Chargée de recherche à l'ICMMO, Orsay  
Professeur à l'Université de Provence, Marseille

## Remerciements

*Ce travail est le résultat de trois années de recherches effectuées au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS-Orléans) dirigé par Monsieur Jean-Claude Beloeil. Ces travaux ont été financés par le CNRS ainsi que par la région Centre.*

*En premier lieu je souhaite adresser un grand merci à Mme Véronique PILLER, ma directrice de thèse pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour m'avoir guidée au cours de cette thèse par son savoir faire et sa disponibilité. Je remercie également M. Friedrich PILLER pour ses conseils.*

*Je tiens à remercier Mme Christine Le NARVOR et M. Assou EL BATTARI pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que M. Olivier MARTIN pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci également à Hervé MEUDAL pour la RMN et Guillaume GABANT et Laëtitia FOUGERE pour la spectrométrie de masse. Merci à eux pour leur disponibilité. Désolée Guillaume de t'avoir embêté avec mes spectres « patates ». Merci à l'équipe de Chimie des protéines d'Agnès DELMAS.*

*Je remercie Patrice ROBERT pour avoir pris soin de mes souris ainsi que Nicole BUREAUD pour l'immunisation des souris. Nicole, ta sympathie m'a manqué pour ma dernière année de thèse !*

*Je remercie toutes les personnes qui sont passées au sein de l'équipe pendant ma thèse : Sylvain BOURGERIE et Rémy MICHEL, Lucie, ma stagiaire spécialiste des ELISA, Anthony, Benjamin, Fahima, Angélique, Rafal.*

*Merci à toutes les personnes du CBM qui ont contribué à rendre ma thèse agréable : Aude, Ibaï, Anthony, Thomas, Lucie...*

*Enfin je remercie chaleureusement mes parents pour m'avoir soutenue pendant toutes ces années d'étude. Merci Antoine pour ton soutien, tu es ma plus belle rencontre dans cette ville que nous apprécions tant !*

# Sommaire

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abréviations.....</b>                                                | <b>8</b>  |
| <b>Introduction.....</b>                                                | <b>11</b> |
| <b>Généralités.....</b>                                                 | <b>13</b> |
| <b>I. La glycosylation.....</b>                                         | <b>14</b> |
| <b>I.1 Fonctions des glycanes .....</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>I.2 Les différentes structures glycaniques.....</b>                  | <b>16</b> |
| I.2.1 Les N-glycanes et les O-glycanes .....                            | 16        |
| I.2.2 Les glycosphingolipides .....                                     | 19        |
| I.2.3 Les glycosaminoglycanes.....                                      | 20        |
| <b>I.3 Biosynthèse des O-glycanes de type mucine.....</b>               | <b>21</b> |
| I.3.1 Les polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases.....          | 21        |
| I.3.2 Synthèse des différentes structures des O-glycanes.....           | 22        |
| <b>II. Glycosylation et maladies.....</b>                               | <b>23</b> |
| <b>II.1 Les glycanes : biomarqueurs du cancer.....</b>                  | <b>23</b> |
| II.1.1 Antigènes glucidiques associés aux cancers.....                  | 23        |
| II.1.2 Rôle des glycanes anormaux dans l'adhérence entre cellules ..... | 27        |
| II.1.3 Utilisation des glycanes pour la détection des cancers.....      | 28        |
| <b>II.2 Le cas des mucines .....</b>                                    | <b>30</b> |
| <b>II.3 Autres maladies .....</b>                                       | <b>32</b> |
| II.3.1 Inflammation .....                                               | 32        |
| II.3.2 Autres maladies.....                                             | 33        |
| <b>III. Utilisation thérapeutique de sucres modifiés.....</b>           | <b>34</b> |
| <b>III.1 Stratégie de vaccination anti-tumorale .....</b>               | <b>34</b> |
| <b>III.2 Synthèse d'antigènes pour une vaccination.....</b>             | <b>36</b> |
| III.2.1 Couplage d'un sucre modifié sur une protéine porteuse.....      | 37        |
| III.2.2 Couplage d'un glycoconjugué sur une protéine porteuse .....     | 38        |
| III.2.3 Utilisation de la Keyhole limpet hemocyanin (KLH) .....         | 39        |
| <b>III.3 Etude immunologique après vaccination.....</b>                 | <b>40</b> |

|              |                                                                                 |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.3.1      | Vaccin semi-synthétique d'antigènes saccharidiques tumoraux .....               | 40        |
| III.3.2      | Vaccin à l'aide d'un peptide .....                                              | 45        |
| III.3.3      | Vaccin de glycoconjugués synthétiques .....                                     | 47        |
| <b>III.4</b> | <b>Incorporation dans les cellules de sucres modifiés .....</b>                 | <b>50</b> |
| III.4.1      | Cas de la N-acétylmannosamine et de l'acide N-acétylneuraminique .....          | 50        |
| III.4.2      | Cas d'analogues du fucose .....                                                 | 51        |
| III.4.3      | Cas d'analogues de la N-acétylglucosamine .....                                 | 52        |
| III.4.4      | Cas de l'acide N-glycolylneuraminique .....                                     | 52        |
| III.4.5      | Cas de la N-acétylgalactosamine .....                                           | 53        |
| <b>IV.</b>   | <b>Sucre d'intérêt : la GalNAc .....</b>                                        | <b>54</b> |
| <b>IV.1</b>  | <b>La GalNAc, une cible pour la vaccination anti-tumorale .....</b>             | <b>54</b> |
| IV.1.1       | La N-acétylgalactosamine, un antigène tumoral .....                             | 54        |
| IV.1.2       | Macrophage galactose lectine de type 2 (MGL2) .....                             | 55        |
| <b>IV.2</b>  | <b>Utilisations d'analogues de la GalNAc .....</b>                              | <b>56</b> |
| <b>IV.3</b>  | <b>O-glycosylation d'un peptide .....</b>                                       | <b>60</b> |
| IV.3.1       | Synthèse du précurseur UDP-sucre .....                                          | 60        |
| IV.3.2       | Voie de synthèse enzymatique d'UDP-sucre mise au point par notre équipe .....   | 62        |
| IV.3.3       | Synthèse de glycopeptides .....                                                 | 63        |
| IV.3.4       | Outils pour vérifier l'incorporation des analogues de la GalNAc .....           | 67        |
|              | <b>Matériels et méthodes .....</b>                                              | <b>71</b> |
| <b>I.</b>    | <b>Synthèse chimique d'analogues de la N-acétylgalactosamine .....</b>          | <b>72</b> |
| <b>I.1</b>   | <b>Matériel .....</b>                                                           | <b>72</b> |
| <b>I.2</b>   | <b>Synthèse des analogues de la GalNAc .....</b>                                | <b>72</b> |
| <b>I.3</b>   | <b>Autres analogues .....</b>                                                   | <b>80</b> |
| <b>I.4</b>   | <b>Acétylation des analogues .....</b>                                          | <b>80</b> |
| <b>II.</b>   | <b>Synthèse enzymatique et caractérisation des dérivés saccharidiques .....</b> | <b>83</b> |
| <b>II.1</b>  | <b>Matériel .....</b>                                                           | <b>83</b> |
| <b>II.2</b>  | <b>Synthèse enzymatique de sucre-1P et d'UDP-sucres .....</b>                   | <b>84</b> |
| II.2.1       | Synthèse de sucre-1P .....                                                      | 84        |
| II.2.2       | Synthèse d'UDP-sucre .....                                                      | 84        |
| <b>II.3</b>  | <b>Synthèse enzymatique de glycoconjugués .....</b>                             | <b>85</b> |

|              |                                                                           |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.3.1       | Synthèse à partir des UDP-sucre                                           | 85        |
| II.3.2       | Synthèse avec tout le cycle enzymatique                                   | 85        |
| <b>III.</b>  | <b>Caractérisation biochimique des dérivés saccharidiques</b>             | <b>86</b> |
| <b>III.1</b> | <b>Matériel</b>                                                           | <b>86</b> |
| <b>III.2</b> | <b>Tests enzymatiques</b>                                                 | <b>86</b> |
| III.2.1      | Calcul de la constante de Michaelis pour GK2                              | 86        |
| III.2.2      | Calcul de la constante de Michaelis pour AGX1                             | 87        |
| III.2.3      | Test enzymatique sur le système « GK2+AGX1 »                              | 87        |
| III.2.4      | Test enzymatique sur la GalNAc $\beta$ 1,3-galactosyltransférase (C1GalT) | 87        |
| III.2.5      | Test enzymatique sur la Sialyltransférase (ST6GalNAc1)                    | 88        |
| <b>III.3</b> | <b>ELISA avec des lectines</b>                                            | <b>88</b> |
| <b>III.4</b> | <b>Test sur MGL-2</b>                                                     | <b>89</b> |
| III.4.1      | Production de MGL-2                                                       | 89        |
| III.4.2      | ELISA sur MGL-2                                                           | 89        |
| <b>III.5</b> | <b>ELISA sur anti-Tn</b>                                                  | <b>89</b> |
| <b>IV.</b>   | <b>Tests immunologiques sur des souris</b>                                | <b>91</b> |
| <b>IV.1</b>  | <b>Matériel</b>                                                           | <b>91</b> |
| <b>IV.2</b>  | <b>Couplage sur une protéine porteuse</b>                                 | <b>91</b> |
| IV.2.1       | Couplage sur KLH                                                          | 91        |
| IV.2.2       | Quantification et caractérisation du couplage                             | 91        |
| IV.2.3       | Couplage sur SAB                                                          | 92        |
| <b>IV.3</b>  | <b>Immunisation des souris</b>                                            | <b>93</b> |
| <b>IV.4</b>  | <b>ELISA</b>                                                              | <b>93</b> |
| <b>V.</b>    | <b>Incorporation des analogues dans les cellules</b>                      | <b>95</b> |
| <b>V.1</b>   | <b>Matériel</b>                                                           | <b>95</b> |
| <b>V.2</b>   | <b>Techniques de FACS et de microscopie confocale</b>                     | <b>95</b> |
| <b>V.3</b>   | <b>Culture cellulaire en présence de sucre</b>                            | <b>96</b> |
| <b>V.4</b>   | <b>Marquage par des lectines</b>                                          | <b>96</b> |
| V.4.1        | Observation par FACS                                                      | 96        |
| V.4.2        | Observation au microscope confocal                                        | 97        |
| <b>V.5</b>   | <b>Marquage par des anti-Tn</b>                                           | <b>97</b> |

|        |                                                                                       |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| V.6    | Marquage par des anti-sérums .....                                                    | 98  |
| VI.    | <i>Techniques de purification et d'analyses biochimiques</i> .....                    | 99  |
| VI.1   | Chromatographie échangeuse d'ions .....                                               | 99  |
| VI.1.1 | Résine d'échanges d'ions .....                                                        | 99  |
| VI.1.2 | FPLC .....                                                                            | 99  |
| VI.2   | HPLC .....                                                                            | 99  |
| VI.3   | La filtration sur gel .....                                                           | 100 |
| VI.4   | Chromatographie d'affinité NiNTA.....                                                 | 100 |
| VI.5   | Gels SDS-PAGE .....                                                                   | 100 |
| VI.6   | Dot-Blot .....                                                                        | 101 |
| VII.   | <i>Techniques de caractérisation des produits</i> .....                               | 102 |
| VII.1  | Chromatographie sur couche mince .....                                                | 102 |
| VII.2  | RMN et Spectrométrie de masse.....                                                    | 102 |
|        | <b>Résultats et discussion</b> .....                                                  | 104 |
| I.     | <i>Synthèse enzymatique de glycoconjugués</i> .....                                   | 105 |
| I.1    | Caractérisation des analogues de la GalNAc vis-à-vis des enzymes du cycle enzymatique | 105 |
| I.1.1  | Article .....                                                                         | 105 |
| I.1.2  | Résumé de cet article .....                                                           | 117 |
| I.1.3  | Conclusion .....                                                                      | 117 |
| I.2    | Synthèse de nucléotides sucres.....                                                   | 120 |
| I.3    | Glycosylation de peptides.....                                                        | 124 |
| I.3.1  | Glycosylation des MUC1 <sub>8</sub> au moyen du cycle enzymatique .....               | 124 |
| I.3.2  | Glycosylation du peptide STP <sub>5</sub> AG .....                                    | 125 |
| I.3.3  | Glycosylation du peptide MUC1 <sub>9</sub> .....                                      | 126 |
| I.3.4  | Synthèse de O-glycanes à partir des analogues .....                                   | 127 |
| I.3.5  | Conclusion .....                                                                      | 129 |
| II.    | <i>Essais d'immunisations de souris</i> .....                                         | 130 |
| II.1   | Evaluation immunologique des MUC1 <sub>8</sub> glycosylés .....                       | 130 |
| II.2   | Immunisations avec des glycopeptides couplés sur une protéine porteuse .....          | 135 |
| II.2.1 | Conjugaison des glycopeptides sur KLH .....                                           | 135 |

|              |                                                                                              |            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.2.2       | Conjugaison des glycopeptides sur SAB .....                                                  | 140        |
| II.2.3       | Evaluation de la quantité de produit à déposer sur plaques ELISA.....                        | 145        |
| II.2.4       | Evaluation immunologique des glycoconjugués .....                                            | 147        |
| <b>II.3</b>  | <b>Conclusion .....</b>                                                                      | <b>153</b> |
| <b>III.</b>  | <b><i>Incorporation des analogues de la GalNAc dans les cellules .....</i></b>               | <b>155</b> |
| <b>III.1</b> | <b>Tests préliminaires avec des lectines.....</b>                                            | <b>155</b> |
| <b>III.2</b> | <b>Essais d'incorporation d'analogues de la GalNAc .....</b>                                 | <b>157</b> |
| III.2.1      | Evaluation de la concentration en sucres à utiliser .....                                    | 157        |
| III.2.2      | Incorporation des sucres dans les cellules et synthèse de glycanes .....                     | 158        |
| <b>III.3</b> | <b>Observation en microscopie confocale.....</b>                                             | <b>161</b> |
| <b>III.4</b> | <b>Etudes préliminaires de la reconnaissance des sucres incorporés par les cellules.....</b> | <b>166</b> |
| III.4.1      | Reconnaissance par des antisérums .....                                                      | 166        |
| III.4.2      | Reconnaissance par un anticorps anti-Tn .....                                                | 167        |
| III.4.3      | Reconnaissance par la lectine animale MGL2 .....                                             | 170        |
| <b>III.5</b> | <b>Conclusion .....</b>                                                                      | <b>171</b> |
|              | <b><i>Conclusions et perspectives .....</i></b>                                              | <b>173</b> |
|              | <b><i>Bibliographie.....</i></b>                                                             | <b>176</b> |

# Abréviations

## Solvants / Tampon :

|      |                           |
|------|---------------------------|
| ATEA | Acétate de triéthylamine  |
| DCM  | Dichloromethane           |
| DMF  | Diméthylformamide         |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde         |
| MeOH | Méthanol                  |
| PBS  | Phosphate buffered saline |
| TBS  | Tris buffered saline      |

## Réactifs :

|          |                                                |
|----------|------------------------------------------------|
| ADP      | Adénosine diphosphate                          |
| ATP      | Adénosine triphosphate                         |
| BCIP     | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate           |
| CMP      | Cytidyl-monophosphate                          |
| CP       | Créatine phosphate                             |
| DTT      | 1,4-Dithiothreitol                             |
| FITC     | Fluorescein isothiocyanate                     |
| FLAG     | Etiquette peptidique reconnue par un anticorps |
| GMBS     | N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimide             |
| HRP      | Horseradish peroxydase                         |
| IgG, IgM | Immunoglobuline G et M                         |
| NBT      | Nitro blue tetrazolium chloride                |
| NiNTA    | Nickel nitriloacétate                          |
| SANH     | 4-hydrozinonicotinate acetone hydrazone        |
| SFB      | 4-formylbenzoate                               |
| TCEP     | Tris(2-carboxyéthyl)phosphine                  |
| UDP      | Uridine diphosphate                            |
| UTP      | Uridine triphosphate                           |

### Sucres :

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| AzidoAc   | N-Azidoacétylgalactosamine   |
| BromoAc   | N-Bromoacétylgalactosamine   |
| ChloroAc  | N-Chloroacétylgalactosamine  |
| Formyl    | N-Formylgalactosamine        |
| Fuc       | Fucose                       |
| Gal       | Galactose                    |
| GalN      | Galactosamine                |
| GalNAc    | N-Acétylgalactosamine        |
| GalNAz    | N-Azidoacétylgalactosamine   |
| Glc       | Glucose                      |
| GlcN      | Glucosamine                  |
| GlcNAc    | N-Acétylglucosamine          |
| Glycolyl  | N-Glycolylgalactosamine      |
| Man       | Mannose                      |
| Neu5Ac    | Acide N-acétylneuraminique   |
| Neu5Gc    | Acide N-glycolylneuraminique |
| Propionyl | N-propionylgalactosamine     |
| Xyl       | Xylose                       |

### Enzymes / Protéines / Lipides :

|        |                                      |
|--------|--------------------------------------|
| AGX1   | UDPGalNAc-pyrophosphorylase 1        |
| C1GalT | Core 1 Galactosyltransferase         |
| CAP    | Calf intestinal alkaline phosphatase |
| CK     | Creatine kinase                      |
| CP     | Creatine phosphate                   |
| GK2    | Galactokinase 2                      |
| KLH    | Keyhole Hemocyanin Limpet            |
| GSL    | Glycosphingolipide                   |
| LDL    | Low density lipoprotein              |
| MUC    | Mucine                               |

### Lectines :

|       |                                           |
|-------|-------------------------------------------|
| GSL-I | <i>Griffonia simplicifolia</i>            |
| HPA   | <i>Helix pomatia</i> agglutinin           |
| MGL2  | Macrophage galactose<br>lectine de type 2 |
| PNA   | Peanut agglutinin                         |
| SBA   | Soybean agglutinin                        |
| SSA   | <i>Sambucus sieboldiana</i><br>agglutinin |
| VVA   | <i>Vicia villosa</i> agglutinin           |
| WFA   | <i>Wisteria floribunda</i><br>agglutinin  |

|             |                                   |
|-------------|-----------------------------------|
| PPA         | Pyrophosphatase inorganique       |
| ppGalNAc T  | Polypeptide GalNAc transférase    |
| SAB         | Sérum albumine bovine             |
| ST6GalNAc I | GalNAcsialyltransférase de type I |

### Biologie :

|               |                                      |
|---------------|--------------------------------------|
| CD            | Cellule dendritique                  |
| CHO           | Chinese Hamster Ovary                |
| CMH           | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>              |
| RE            | Réticulum endoplasmique              |

### Techniques / Analyses :

|          |                                                           |
|----------|-----------------------------------------------------------|
| CCM      | Chromatographie sur couche mince                          |
| COSY     | Correlated spectroscopy                                   |
| cpm      | Coups par minute                                          |
| ELISA    | Enzyme linked Immunosorbent assay                         |
| Eq       | Equivalent                                                |
| ESI      | Electrospray ionisation                                   |
| FACS     | Fluorescence activated cell sorter                        |
| HPLC     | High performance liquid chromatography                    |
| Km       | Constante de Michaelis                                    |
| MALDI    | Matrix assisted laser desorption ionisation               |
| RMN      | Résonance magnétique nucléaire                            |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SM       | Spectrométrie de masse                                    |
| TA       | Température ambiante                                      |

# *Introduction*

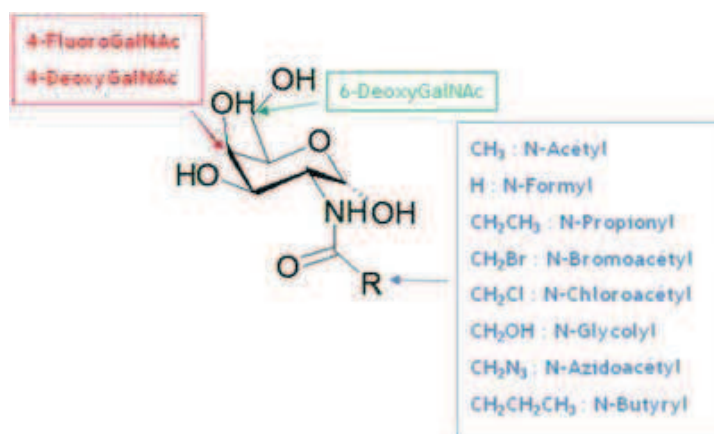
Les glycanes sont des oligosaccharides liés aux protéines et aux lipides et sont présents à la surface des cellules. Ainsi ils peuvent être reconnus de manière spécifique par des récepteurs ce qui leur permet de remplir différents rôles de reconnaissance tels que l'interaction entre cellules ou l'adhérence d'agents pathogènes.

Les glycanes constituent aussi des antigènes glucidiques et sont importants pour l'étude de l'immunothérapie du cancer. En effet, les glycanes sont rencontrés fréquemment à la surface des cellules tumorales sous une forme modifiée par rapport aux cellules saines. Cependant ces glycanes sont déjà présents dans l'organisme soit lors du développement embryonnaire, soit dans les tissus matures et sains où ils ne sont trouvés qu'en très faible quantité par rapport aux tumeurs. Ainsi les antigènes glucidiques tumoraux sont reconnus par l'organisme comme antigènes du soi. et la réponse immune n'est pas efficace. Au cours de ces dernières années, ces antigènes glucidiques ont été la cible de tentatives de vaccination anti-tumorale. Une stratégie récemment développée dans le but d'augmenter la réponse immune consiste à injecter un vaccin composé de dérivés des antigènes glucidiques tumoraux comportant des sucres modifiés.

Nous nous sommes intéressés à la biosynthèse de glycoconjugués et plus particulièrement à ceux de type mucine. Les mucines sont des glycoprotéines surexprimées dans de multiples cancers épithéliaux (sein, poumons, pancréas, estomac, colon, prostate, ovaires, col de l'utérus...). Les cellules cancéreuses présentent des mucines dont la glycosylation -notoirement la *O*-glycosylation- est altérée. La *O*-glycosylation de type mucine se caractérise par la fixation sur des Ser ou Thr d'un premier sucre : la N-acétylgalactosamine (GalNAc) à partir de sa forme activée, l'UDP-GalNAc. Cette étape initiale est normalement suivie par la fixation d'autres sucres, mais sur les mucines des cellules cancéreuses, la *O*-glycosylation est réduite à la fois au niveau du nombre des glycanes fixés, de la longueur et de la complexité de ces glycanes. La GalNAc est alors un sucre plus accessible aux anticorps.

Notre projet a consisté à préparer des analogues synthétiques de la GalNAc susceptibles d'être incorporés sur des glycoconjugués, d'analyser la réponse immune vis-à-vis des glycopeptides portant ces analogues synthétiques dans la souris et d'étudier leur capacité à être intégrés dans les glycoconjugués à la surface de cellules cancéreuses et dans les mucines synthétisées par les tumeurs.

Nous avons donc synthétisé de façon chimique des analogues de la GalNAc capables d'être des substrats de la voie *in vivo* dite « de sauvetage » ou « auxiliaire » de la GalNAc, c'est-à-dire des enzymes galactokinase (GK2,) UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1) qui sont responsables de la synthèse de la forme UDP-sucre. Le sucre activé a ensuite été testé vis-à-vis de la polypeptide  $\alpha$ GalNAc transférase T1 (ppGalNAc T1), une glycosyltransférase incorporant le sucre sur une protéine. Les analogues testés sont modifiés en diverses positions de la GalNAc (figure 1).



**Figure 1.** Représentation des analogues de la GalNAc synthétisés par voie chimique et testés en tant que substrats de la voie de « sauvetage » de la GalNAc.

Divers glycopeptides ont ainsi été préparés avec les analogues qui sont les meilleurs substrats des enzymes GK2, AGX1 et ppGalNAc T1. Ils ont ensuite servi pour l'immunisation de souris, l'objectif étant la production d'anticorps spécifiques des sucres. Deux séries d'injection ont été réalisées : une première avec des composés de type mucine glycosylée, une deuxième avec des glycopeptides couplés à la KLH, une protéine immunostimulante. La réponse immune a été étudiée par ELISA.

En parallèle, nous avons suivi l'incorporation de ces sucres modifiés à la surface de cellules.

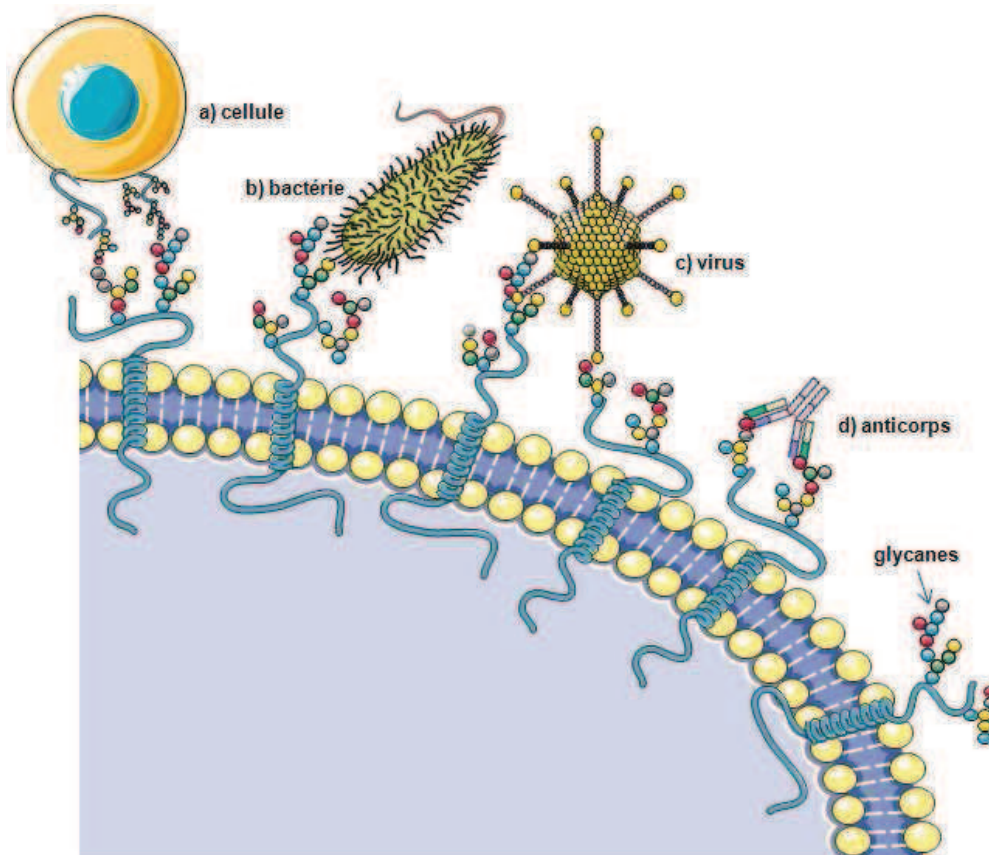
# ***Généralités***

## I. La glycosylation

Les glycanes sont un enchaînement de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique. Ils forment des chaînes linéaires ou ramifiées qui, fixées à des protéines ou des lipides, participent à une grande variété de processus biologiques. La glycosylation est une des modifications post-traductionnelles les plus courantes des protéines. En effet, plus de 50 % des protéines eucaryotes sont glycosylées.

### I.1 Fonctions des glycanes

Il existe à la surface des cellules un grand nombre de glycanes liés soit à des protéines soit à des glycolipides. Leurs structures variables et complexes leur permettent d'être reconnus de manière spécifique par des récepteurs et de remplir ainsi différents rôles de signalisation, de reconnaissance ou d'adhérence (Sharon et Lis, 1993) (Yarema et Bertozzi, 1998) (figure 1).



**Figure 1.** Les glycanes exprimés à la surface des cellules participent à la reconnaissance d'autres cellules, de bactéries, de virus et d'anticorps (à l'aide de Servier Medical Art).

a) Les glycanes présents à la surface des cellules participent aux interactions entre cellules. Par exemple, ils sont indispensables au recrutement des leucocytes par les sites d'inflammation ou par les ganglions lymphatiques. En effet plusieurs glycosyltransférases sont impliquées dans la synthèse des glycanes reconnus par la famille des sélectines : L-sélectine (exprimée par les leucocytes), E-sélectine (exprimée par les cellules endothéliales) et P-sélectine (exprimée par les plaquettes) qui reconnaissent les fucoses et les acides N-acétyl neuraminiques (acides sialiques). Ces lectines interviennent dans l'interaction entre les globules blancs et les cellules endothéliales durant le processus de recrutement des leucocytes au niveau d'un site d'inflammation (McEver, 1997) (Sperandio *et al.*, 2009).

b) Les sucres présents à la surface des cellules peuvent être utilisés par des bactéries pour adhérer et coloniser un organisme. *Helicobacter pylori* est une bactérie à Gram négatif présente dans les estomacs de plus de la moitié des personnes. La colonisation de cette bactérie provoque en général des attaques gastriques et même dans certains cas des ulcères, des adénocarcinomes gastriques et des lymphomes au niveau des muqueuses. L'adhérence de *H. pylori* est régulée par les glycanes exprimés au niveau du système gastrique de l'hôte. *H. pylori* est sélective de la structure Lewis<sup>b</sup> ainsi que de nombreuses structures saccharidiques sialylées (Magalhães *et al.*, 2010).

c) Le virus de la grippe infecte les cellules de l'hôte par différentes étapes initiées par la fixation de l'hémagglutinine de l'enveloppe virale sur un acide sialique terminal des glyconconjugués exprimés par la cellule hôte (Gamblin et Skehel, 2010).

d) Les glycanes forment des structures antigéniques reconnues spécifiquement par des anticorps. Dans certains cas, une seule unité saccharidique peut être antigénique. Dans d'autres cas, les anticorps sont dirigés contre le glycopeptide en reconnaissant la structure saccharidique ainsi que les acides aminés adjacents (Lisowska, 2002). Cette partie sera discutée par la suite.

## I.2 Les différentes structures glycaniques

### I.2.1 Les *N*-glycanes et les *O*-glycanes

(Ghazarian *et al.*, 2010)

Il existe trois types de structures oligosaccharidiques qui peuvent se lier aux protéines : les *N*-glycanes, les *O*-glycanes et les *C*-glycanes ou plus exactement la *C*-mannosylation où un seul résidu mannose est lié par son C1 en  $\alpha$  sur le C2 du noyau indole d'un tryptophane (Furmanek et Hofsteenge, 2000). Cette forme de glycosylation très peu rencontrée ne sera pas détaillée par la suite.

#### ➤ Les *N*-glycanes

Les *N*-glycanes sont liés aux protéines membranaires et sécrétés de façon covalente au groupement amide d'une asparagine (Asn). Tous les *N*-glycanes comportent la structure core :  $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}-\text{X}-\text{Ser}/\text{Thr}$  et sont classés en trois catégories (figure 2) :

- les polymannoses qui ne comportent que des résidus mannoses attachés sur le core.
- les oligosaccharides complexes avec plusieurs ramifications appelées antennes, constituées de Gal, de GlcNAc, Neu5Ac, de Fuc et de GalNAc.
- les oligosaccharides hybrides où seuls des résidus mannoses sont liés au mannose en  $\alpha 1-6$  du core et une ou deux antennes sont liées sur le mannose en  $\alpha 1-3$  du core.

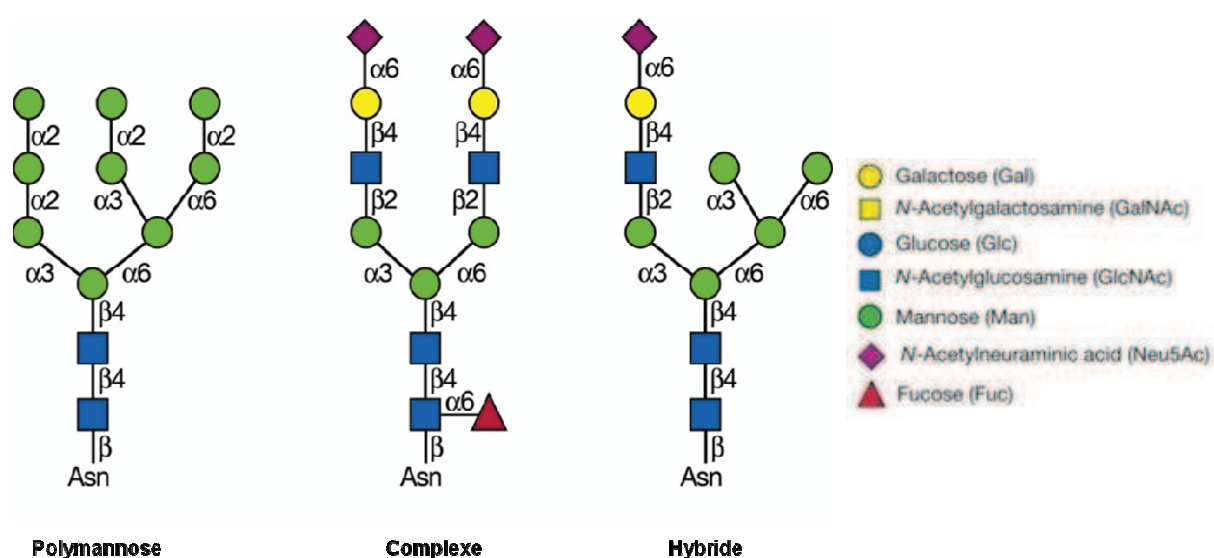
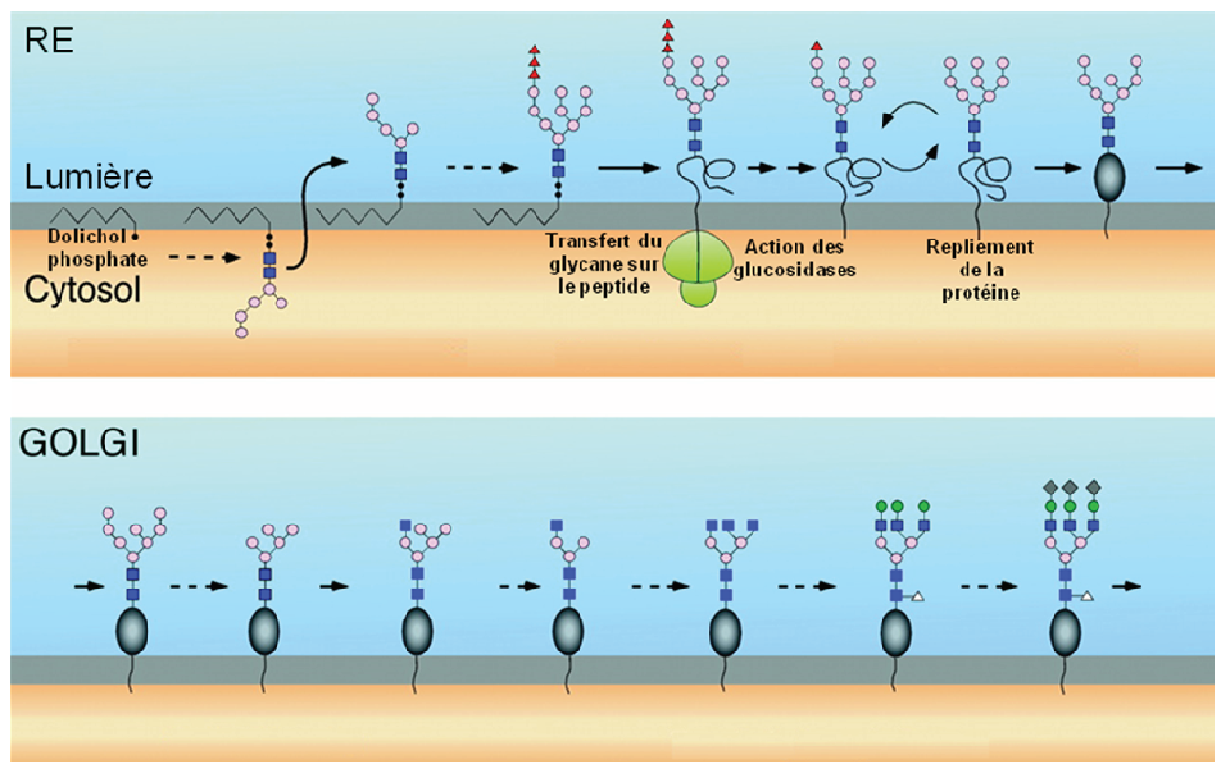


Figure 2. Représentation des différents types de *N*-glycanes (Varki *et al.*, 2009).

La synthèse des *N*-glycanes commence sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique où les sucres sont ajoutés un à un à une molécule porteuse, le dolicholdiphosphate. Le glycane préformé sur le dolicholdiphosphate est ensuite transporté dans la lumière du réticulum endoplasmique où d'autres sucres (Man et Glc) lui sont ajoutés ; puis il est transféré à l'asparagine du peptide et trois Glc et un Man sont ensuite enlevés du *N*-glycane par des osidases. Puis la glycoprotéine est exportée du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Dans le Golgi, des Man sont encore enlevés et d'autres monosaccharides sont ajoutés (GlcNAc, GalNAc, Gal, Fuc et Neu5Ac) (figure 3) (Helenius et Aebi, 2001).



**Figure 3.** Synthèse des *N*-glycanes d'après (Helenius et al., 2001).

La *N*-glycosylation aide au repliement des protéines nouvellement synthétisés dans le RE. La *N*-glycosylation est en effet une modification co-traductionnelle. L'importance des glycanes ajoutés varie d'une protéine à une autre ; néanmoins il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les sucres avaient un effet sur le repliement et qu'ils augmentaient la solubilité des protéines. D'autre part les *N*-glycanes sont impliqués dans un processus de contrôle qualité des glycoprotéines faisant intervenir un chaperon et assurant l'acheminement des glycoprotéines vers l'appareil de Golgi seulement quand elles sont correctement repliées.

### ➤ les O-glycanes

La O-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui intervient pour la majorité des O-glycanes dans l'appareil de Golgi (Röttger *et al.*, 1998). Elle se traduit par la fixation d'un sucre (Fuc, Gal, xylose (Xyl), Man, Neu5Ac, GlcNAc, GalNAc) au niveau d'un groupement hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine. Après l'addition de ce premier sucre, d'autres saccharides comme le galactose, le fucose, la N-acétylglucosamine, un acide sialique ou la GalNAc peuvent être fixés. Il existe différents types de O-glycosylation (O-GalNAc, O-Xyl, O-Fuc, O-Man, O-Glc dans le RE/Golgi, O-GlcNAc dans noyau et cytosol (Haltiwanger et Lowe, 2004)), la plus courante étant la O-glycosylation de type mucine (décrite dans le paragraphe suivant).

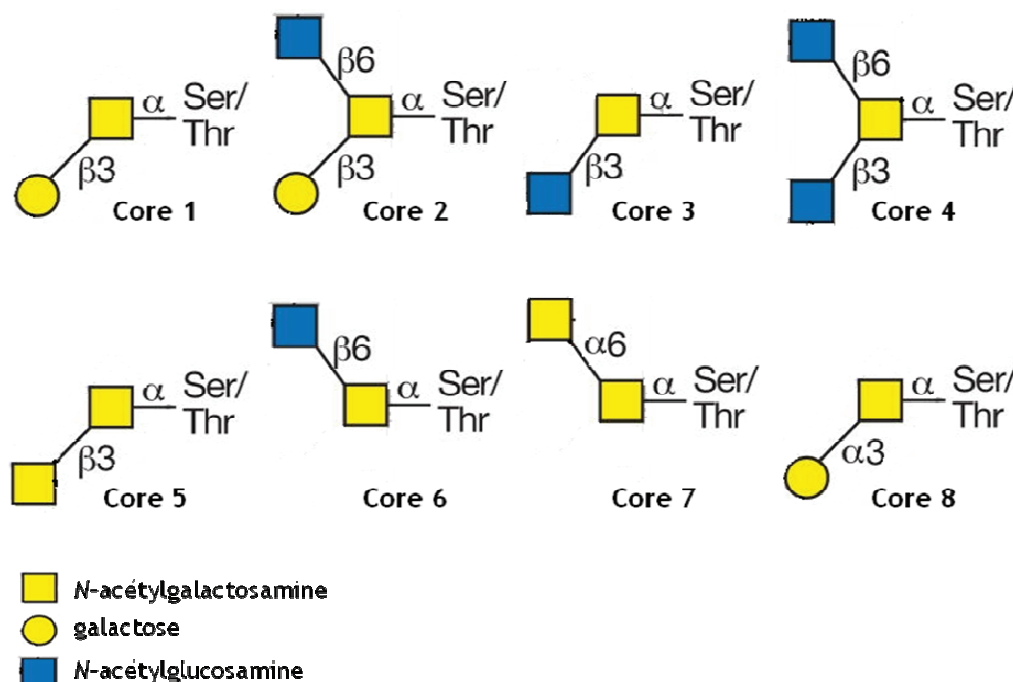
### ➤ les O-glycanes de type mucine (Hanisch, 2001)

La O-glycosylation de type mucine est une modification post-traductionnelle initiée par la fixation d'un résidu de GalNAc sur une sérine ou une thréonine d'une protéine sécrétée ou membranaire. Cette réaction qui est localisée dans le Golgi est catalysée par une famille d'enzymes, les polypeptides : N-acétylgalactosaminyltransférases. Il semble que chaque enzyme ait des propriétés un peu différentes vis-à-vis du peptide accepteur, même si aucune ne reconnaît une séquence consensus précise et si elles montrent toutes beaucoup de redondance dans leur spécificité de reconnaissance des peptides. Plusieurs, parmi ces enzymes, ne reconnaissent que des glycopeptides et toutes ne semblent pas localisées dans le même sous-compartiment du Golgi et par ce fait interagissent de façon séquentielle sur le glycopeptide en cours de synthèse. C'est donc à la fois la multiplicité des isoformes de polypeptides : N-acétylgalactosaminyltransférases, leur localisation différente et leur relative spécificité de reconnaissance des peptides ou glycopeptides qui permet la glycosylation de la grande multiplicité des sites à pourvoir (Ten Hagen *et al.*, 2003).

Les mucines sont des protéines sécrétées ou transmembranaires présentes dans les sécrétions des muqueuses et à la surface des cellules épithéliales. Les mucines sécrétées sont des protéines de haut poids moléculaire fortement glycosylées (50 à 90 % du poids de la protéine). Elles sont formées de motifs répétitifs riches en sérine/thréonine/proline.

La structure des O-glycanes de type mucine est divisée en trois régions : le core qui comprend les 2 ou 3 premiers sucres, le squelette qui constitue une elongation (linéaire ou branchée) de la chaîne et enfin la région périphérique qui forme une structure complexe

représentant des antigènes comme les antigènes de groupes sanguins A, B, O et Lewis. Le O-glycane le plus simple est formé par la GalNAc fixée sur une sérine ou une thréonine. Il forme l'antigène Tn. D'autres sucres peuvent être fixés sur la GalNAc pour constituer des structures de core (figure 4). Ces différents cores sont ensuite allongés par d'autres résidus (fucose, acide sialique...) qui peuvent être sulfatés. La longueur des glycanes d'une mucine peut aller d'un résidu (GalNAc) jusqu'à 30 oses et leur hétérogénéité peut être énorme. Dans certaines maladies comme le cancer, cette hétérogénéité peut être réduite, les nouvelles structures devenant alors des cibles pour un diagnostic ou un traitement.



**Figure 4.** Représentation des différentes structures core des O-glycanes de type mucine (Varki et al., 2009).

➤ autres :

Il existe d'autres types de glycanes comme au niveau des protéines qui possèdent un domaine de collagène où le motif Glcα1-2Galβ est fixé sur une hydroxylysine ou une hydroxyproline ou encore les protéoglycanes constitués de glycosaminoglycanes liés à un xylose sur une sérine.

### 1.2.2 Les glycosphingolipides

Les glycosphingolipides (GSL) sont une famille de lipides présents au niveau de la membrane cellulaire. Ils constituent la majorité des glycanes du cerveau des vertébrés.

## Généralités

Les GSL se composent d'un céramide. Un céramide comporte une sphingosine (amino alcool à longue chaîne) à laquelle est liée par une liaison amide une chaîne d'acides gras. Sur ce céramide, une chaîne d'oligosaccharides est fixée. Il existe plus de 60 bases céramides (selon la saturation, la longueur ou l'hydroxylation de la sphingosine et de la chaîne d'acides gras) ainsi que plus de 300 chaînes oligosaccharidiques. Les GSL présentent donc une grande hétérogénéité de structure (Degroote *et al.*, 2004), (Sonnino *et al.*, 2007).

Les premiers sucres fixés sur le céramide définissent les différentes familles de GSL :

| Famille  | Symbole | Structure                                                            |
|----------|---------|----------------------------------------------------------------------|
| Ganglio  | Gg      | Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer    |
| Lacto    | Lc      | Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer    |
| neolacto | nLc     | Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer    |
| Globo    | Gb      | GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer   |
| Isoglobo | iGb     | GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer   |
| Mollu    | Mu      | GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer   |
| Arthro   | At      | GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Man $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer |

**Tableau 1. Nomenclature des lipides d'après**

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/glylp.html>

Les GSL sialylés sont appelés gangliosides. Leur nomenclature se fait selon leur famille, leur nombre d'acides sialiques ainsi que leur ordre de migration par CCM (système de Svennerholm).

Les GSL ont différents rôles (Hakomori, 2003). Ils entrent dans la composition des membranes plasmiques (Sonnino *et al.*, 2007) et sont donc des récepteurs connus de plusieurs voies de signalisation, ce sont des médiateurs de l'adhérence entre cellules ou encore des modulateurs d'un signal de transduction. Les glycanes des GSL sont également des antigènes. En effet leur composition change au cours du développement et certains types de GSL, absents des tissus normaux adultes réapparaissent lors de certains cancers et sont alors des molécules impliquées dans la modification de l'adhérence des tumeurs. Ce sont donc des cibles pour le diagnostic et le traitement de tumeurs (Hakomori, 1996).

### 1.2.3 Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des chaînes linéaires polysaccharidiques qui, liées à des protéines, forment les protéoglycanes. Les glycosaminoglycanes sont formés d'un motif

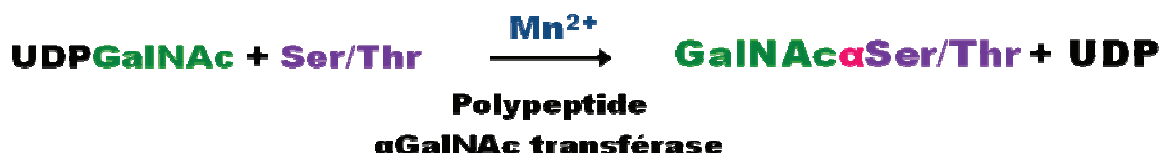
répétitif disaccharidique composé d'un amino sucre (GlcNAc, GalNAc...) et d'un acide uronique (acide glucuronique, GlcA ou acide iduronique, IdoA) ou d'un Gal. Ces chaînes sont sulfatées et contribuent ainsi de façon importante aux charges négatives de la surface cellulaire. Les protéoglycanes sont présents dans le glycocalyx de toutes les cellules mais sont plus abondants dans les tissus conjonctifs. Par leur capacité à lier les facteurs de croissance, ils jouent également un rôle dans la biologie du cancer.

### I.3 Biosynthèse des O-glycanes de type mucine

(Ten Hagen *et al.*, 2003), (Hang et Bertozzi, 2005)

#### I.3.1 Les polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases

La O-glycosylation de type mucine se caractérise par la fixation d'une N-acétylgalactosamine sur une sérine ou une thréonine à l'aide d'une enzyme de la famille des polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases. Ces enzymes utilisent la GalNAc sous sa forme activée : UDP-GalNAc. Elles ont également besoin d'un cofacteur : le Manganèse (figure 5). Après réaction, la GalNAc est fixée par une liaison en  $\alpha$  à la protéine.



**Figure 5.** Fixation de la GalNAc à l'aide d'une polypeptide GalNAc transférase.

Leur activité a été découverte en 1967 (McGuire et Roseman, 1967) et elles ont été purifiées pour la première fois à partir de colostrum bovin et d'un lymphome de souris (Elhammer et Kornfeld, 1986). Vingt gènes sont connus dans le génome humain qui codent pour des isoformes de la ppGalNAc transférase et 18 chez la souris. Jusqu'à présent, 14 ppGalNAcT fonctionnelles de différentes espèces ont été clonées et exprimées. Elles présentent 90 à 98 % d'homologie entre les différentes espèces de mammifères.

Le niveau d'expression des ppGalNAcT varie selon les espèces et les tissus. Les sites et les taux de glycosylation sont différents selon le type de ppGalNAcTs exprimées dans chaque type de cellules. Beaucoup de ppGalNAcT fixent in vitro plus facilement le GalNAc sur une thréonine plutôt que sur une sérine. Il semble même qu'il existe un ordre dans lequel les ppGalNAcT interviennent. Ainsi certaines ppGalNAcT ne fixeront un GalNAc que si une sérine ou une thréonine adjacente est déjà glycosylée. De plus la glycosylation peut

aussi être affectée suivant le repliement de la protéine entrant dans l'appareil de Golgi ce qui peut rendre certains sites inaccessibles (Hanisch, 2001).

### I.3.2 Synthèse des différentes structures des O-glycanes

La GalNAc est le premier sucre fixé au niveau d'une sérine ou thréonine. D'autres sucres sont ensuite ajoutés pour former les différentes structures core. Ainsi la structure core 1 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Thr/Ser) est formée par l'addition d'un galactose sur la GalNAc par l'enzyme  $\beta$ 1-3 galactosyltransférase ou Core1Galactosyltransférase1 (C1GalT-1) ou encore T synthase. Cette enzyme transfère le Gal à partir de sa forme activée UDP-Gal et c'est une des enzymes clé de la biosynthèse des O-glycanes car elle est responsable de la synthèse des structures cores 1 et 2. La C1GalT est la seule enzyme à catalyser la réaction Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thr et son activité est dépendante de la présence de sa chaperonne spécifique qui seule peut assurer le bon repliement de l'enzyme (Aryal *et al.*, 2010). Dans plus de 80 % d'adénocarcinomes l'activité de C1GalT est diminuée ou absente à cause de mutations dans la chaperonne ce qui résulte en une terminaison précoce de la biosynthèse des O-glycanes à core 1 et core 2. La biosynthèse de core 2 est catalysée par une  $\beta$ 6 GlcNAc transférase spécifique qui branche, à partir d'UDP-GlcNAc, une GlcNAc en position 6 de GalNAc de la structure core1. La synthèse des structures core 3 et core 4 est assurée par une  $\beta$ 3 et une  $\beta$ 6 GlcNAc transférases. Les GlcNAc sur core 2, 3 et 4 sont rallongées par les galactoses et ces réactions sont exécutées par un grand nombre de galactosyl transférases. Dans la plupart des O-glycanes de type mucine les sucres terminaux sont des acides sialiques qui sont ajoutés sur les galactoses en position 3 et 6 par des sialyl transférases spécifiques comme la ST3GalIV. Toutes les sialyltransférases transfèrent un acide sialique à partir d'une forme activée, l'acide cytidyl-monophospho-N-acétylneuraminique (CMP-Neu5Ac). Dans les O-glycanes, le sucre d'attache, le GalNAc, est aussi sialylé en position 6. Cette réaction est catalysée par la famille des ST6GalNAc transférases qui transfèrent l'acide sialique sur la GalNAc déjà substituée en position 3. Seule la ST6GalNAc I est capable de transférer un acide sialique sur GalNAc-Ser/Thr et cette enzyme est aussi appelée sialyl-Tn synthase. Une surexpression de ST6GalNAc I peut terminer précocement la biosynthèse des O-glycanes en bloquant la synthèse des structures core2, 3 et 4 (Harduin-Lepers, 2010).

Les motifs Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Thr/Ser et Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc-Thr/Ser forment respectivement les structures T (ou TF) et sialyl Tn, des antigènes tumoraux bien connus (voir partie suivante).

## II. Glycosylation et maladies

### II.1 Les glycanes : biomarqueurs du cancer

Le cancer est un des principaux problèmes actuels de santé puisqu'on estime à l'heure actuelle que plus d'une personne sur trois sera touchée par le cancer au cours de sa vie. Plus la maladie est diagnostiquée tôt, plus le traitement peut être commencé tôt et meilleur sera le taux de survie. En effet le pourcentage de survie est de 5 à 10 % lors de cancers avancés et disséminés des poumons et du colon contre 50 à 90 % lorsque le cancer est localisé. Le dépistage et l'amélioration des techniques de détection sont donc primordiaux.

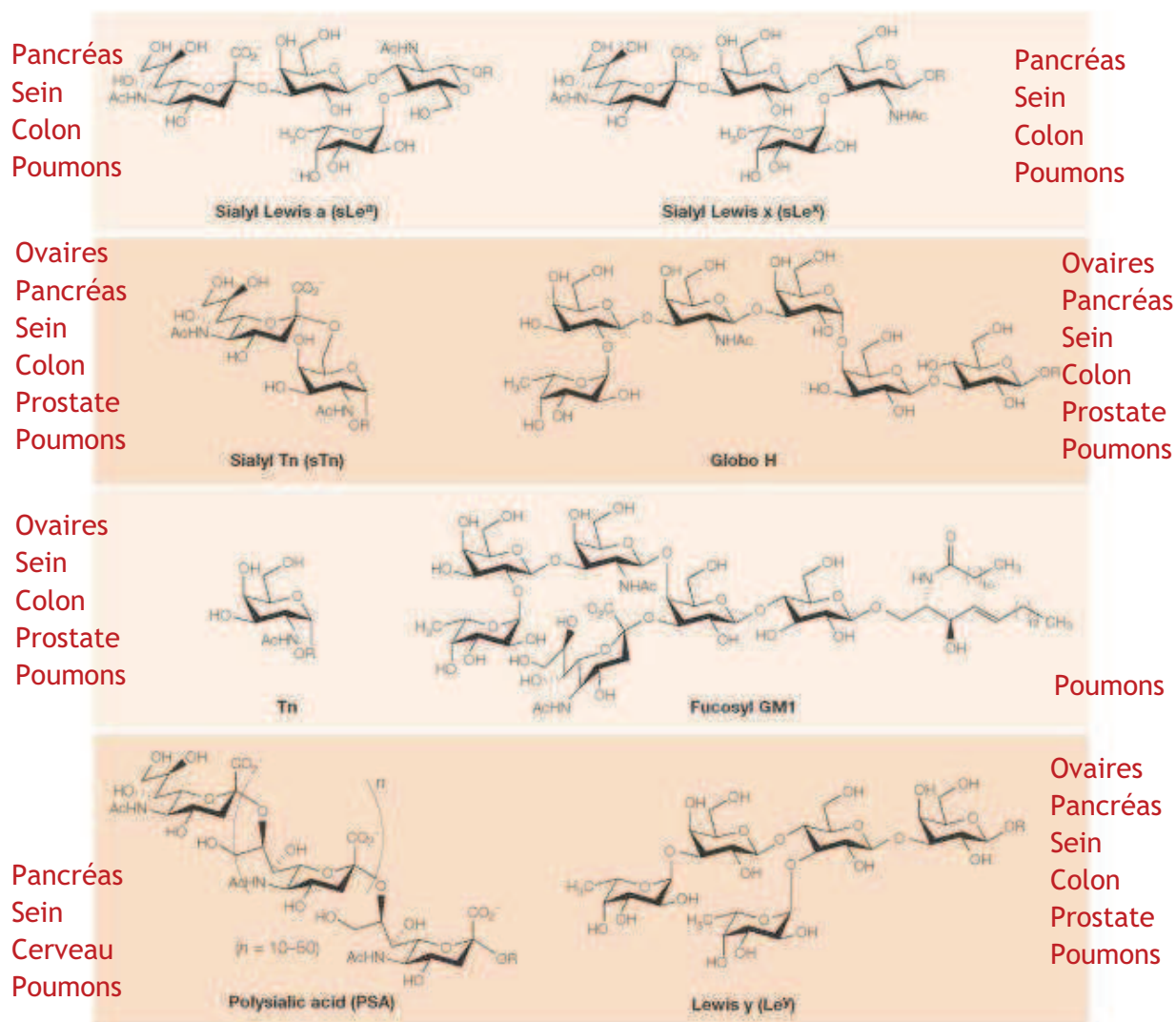
Les glycanes sont des cibles dans le diagnostic et le traitement du cancer. En effet, il y a plusieurs décennies, il a été démontré que la structure des glycanes présents à la surface des cellules eucaryotes était modifiée dans le cas de cellules cancéreuses (Meezan *et al.*, 1969). Cette découverte a ensuite été confirmée par la différence de marquage par des lectines observée en des tissus sains et des tissus malades. Dès les années 1970, l'existence d'antigènes spécifiques des tissus cancéreux a été mise en évidence par diverses études immunologiques comme par exemple l'utilisation d'anticorps radiomarqués (Gorsky *et al.*, 1976). Depuis ces antigènes anormaux ont été caractérisés par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Pancino *et al.*, 1991), (Matsushita *et al.*, 1990).

#### II.1.1 Antigènes glucidiques associés aux cancers

Différentes structures de glycanes modifiés ont été mises en évidence (tableau 2 et figure 6). Plusieurs types de glycanes sont tronqués par rapport à leur version normale ou au contraire allongés et ramifiés comme c'est notamment le cas des *N*-glycanes ; d'autres présentent des structures terminales modifiées. Ces structures proviennent en général d'un changement du niveau d'expression des glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi des cellules cancéreuses (Dennis *et al.*, 1999). Par exemple, dans le cas des *N*-glycanes, l'augmentation de leur ramification est due à la hausse de l'activité de la *N*-acétylglucosaminyltransférase V (GlcNAc-TV ou MGAT5) responsable de la fixation de la GlcNAc en  $\beta 6$  sur un Man du core. D'autre part, les sialyltransférases et les fucosyltransférases ont leur activité augmentée dans les cellules tumorales ce qui conduit à la surexpression de certains types de glycanes terminaux riches en acides sialiques et en fucoses (figure 6). L'ajout d'un acide sialique sur les *O*-glycanes bloque l'activité des

GlcNAc- et Gal-transférases. Les chaînes des O-glycanes sont alors plus courtes que celles des O-glycanes présents à la surface des cellules saines. Par exemple, certaines lignées de cellules du cancer du sein surexpriment une  $\alpha$ 3-sialyltransférase par rapport aux cellules normales (Brockhausen *et al.*, 1995a). De nombreux épitopes sialylés sont retrouvés sur les cellules cancéreuses du sein et sont synonymes d'un faible taux de survie. Un autre exemple est l'antigène de Thomsen Friedenreich (TF, Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr). Normalement, dans les cellules épithéliales du sein, après la fixation du galactose sur le GalNAc, la  $\beta$  1,6-GlcNAc-transférase catalyse la fixation d'une GlcNAc sur la GalNAc pour former le core 2. Or cette enzyme est sous exprimée dans les tissus du cancer du sein (Brockhausen *et al.*, 1995b) entraînant l'augmentation de la présence de l'antigène TF.

A la surface des cellules cancéreuses, certaines glycoprotéines comme les mucines (voir partie suivante) et des glycolipides sont surexprimés (Hakomori et Zhang, 1997). En effet le GM3 (tableau 2) est un antigène associé au mélanome chez la souris, le hamster et l'homme (Nores *et al.*, 1987). D'autres gangliosides sont retrouvés également en quantité importante dans certains cancers (Hakomori, 2000).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 6.** Exemples de différents antigènes tumoraux ainsi que les tissus où ils sont exprimés (Dube et Bertozzi, 2005), (Zhang et al., 1997a), (Zhang et al., 1997).

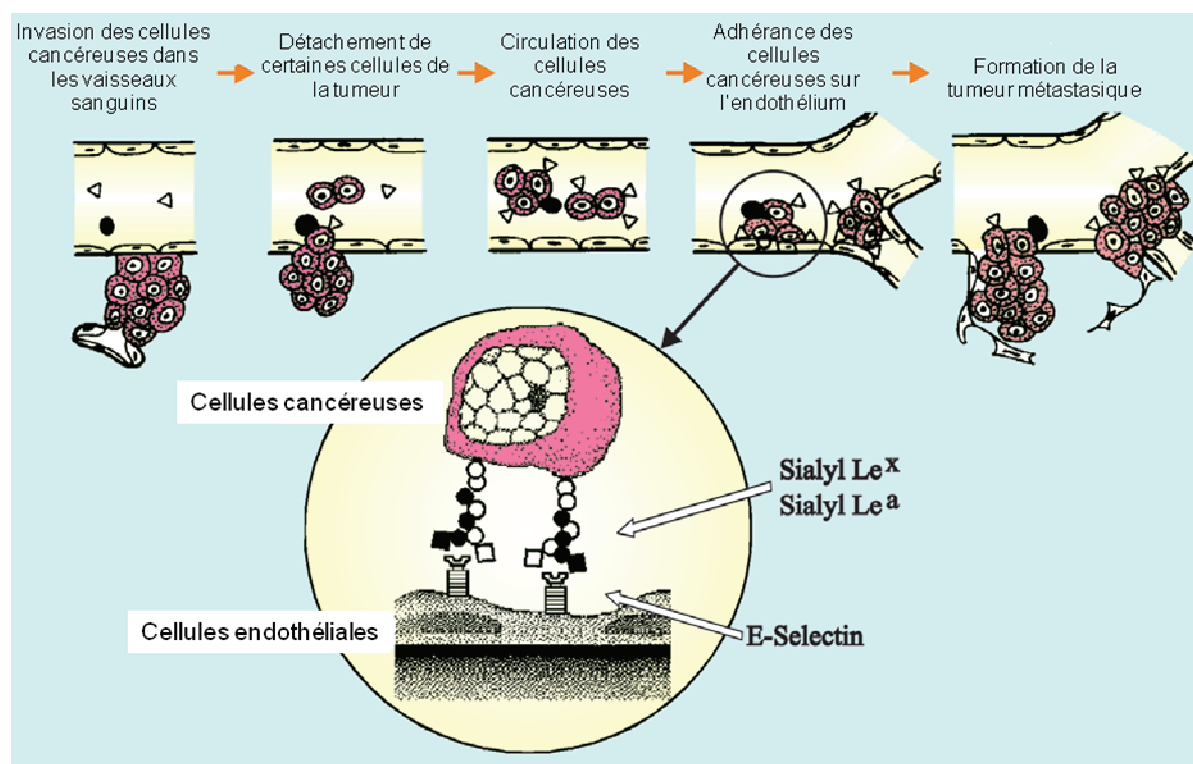
| Dénomination                            | Structure                                                                | Tissus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tn et sialyl Tn</b>                  | GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr<br>NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr | Colon (Itzkowitz <i>et al.</i> , 1989)<br>Utérus (Terasawa <i>et al.</i> , 1996)<br>Poumons (Laack <i>et al.</i> , 2002)<br>Sein (Fernández Madrid <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                                                                                  |
| <b>TF ou T</b>                          | Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr                                 | Colon (Campbell <i>et al.</i> , 1995), (Baldus <i>et al.</i> , 2000)<br>Sein (Kumar <i>et al.</i> , 2005a)<br>Vessie (Coon <i>et al.</i> , 1982)<br>Prostate (Zhang <i>et al.</i> , 1997b)<br>Foie (Cao <i>et al.</i> , 1996)<br>Brockhausen, <i>et al.</i> , 1995b<br>Ovaires (Ghazizadeh <i>et al.</i> , 1990)<br>Estomac (Baldus <i>et al.</i> , 2001) |
| <b>Sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>)</b> | Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3) GlcNAc-Ser/Thr      | Sein (Nakagoe <i>et al.</i> , 2002)<br>Vessie (Ohyama, 2008)<br>Pancréas, Colon, Poumons (Zhang <i>et al.</i> , 1997), (Zhang <i>et al.</i> , 1997a)                                                                                                                                                                                                      |
| <b>GM2</b>                              | GalNAc $\beta$ 1-4(NeuAc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer  | Sein, Colon, Poumons, Mélanome, Ovaires, Prostate, Estomac (Zhang <i>et al.</i> , 1997)                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>GM3</b>                              | NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer                      | Mélanome (Hamilton <i>et al.</i> , 1993)<br>Sein (Marquina <i>et al.</i> , 1996)<br>Colon (Ogata <i>et al.</i> , 1995)<br>Poumons (Alonso <i>et al.</i> , 1999)<br>Prostate (Ravindranath <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                                           |
| <b>GD3</b>                              | NeuAc $\alpha$ 2-8NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer    | Mélanome (Tsuchida <i>et al.</i> , 1987)<br>Sein (Cazet <i>et al.</i> , 2009)<br>Prostate (Ravindranath <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                                                                                                                             |

**Tableau 2.** Exemples de quelques antigènes tumoraux ainsi que les tissus où ils sont exprimés.

Le principal problème avec ces antigènes tumoraux est qu'ils n'induisent pas de réponse immune. En effet ces glycanes sont exprimés à la surface des cellules saines et ils sont surexprimés dans le cas de cellules cancéreuses. Ainsi ils sont reconnus comme des antigènes du « soi » et il se produit un phénomène de tolérance.

### II.1.2 Rôle des glycanes anormaux dans l'adhérence entre cellules

Ces structures glycaniques sont impliquées dans l'adhérence des cellules cancéreuses. Par exemple, l'antigène sialyl Lewis<sup>a</sup> participe à l'adhérence au niveau des cellules endothéliales des cellules cancéreuses issues des organes digestifs comme le colon et le pancréas tandis que l'antigène sialyl Lewis<sup>x</sup> joue un rôle dans l'adhérence des cellules tumorales du sein, des ovaires et des poumons (Takada *et al.*, 1993). Les antigènes sialyl Lewis<sup>x/a</sup> présents à la surface des cellules cancéreuses servent de ligands à la E-sélectine des cellules endothéliales. Cette interaction pourrait également être impliquée dans la dissémination de métastases c'est-à-dire dans le passage de cellules tumorales à travers la paroi des vaisseaux sanguins (figure 7).

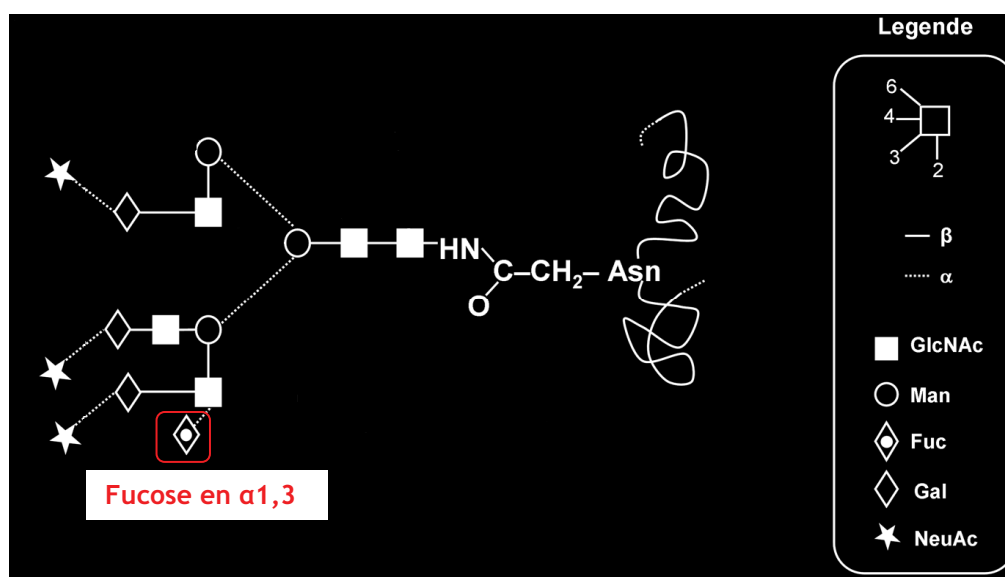


**Figure 7.** Représentation schématisée de la formation de métastases (Kannagi *et al.*, 2004).

Il a également été montré que l'interaction entre l'antigène TF notamment lorsqu'il est présent sur des mucines membranaires et la galectine-3 associée aux cellules endothéliales était importante lors de l'adhérence de cellules cancéreuses du sein et de la prostate avec l'endothélium (Glinsky *et al.*, 2001), (Yu *et al.*, 2007). De même l'interaction entre l'antigène TF et la galectine-3 associée aux cellules cancéreuses participe à l'agrégation entre cellules cancéreuses.

### II.1.3 Utilisation des glycanes pour la détection des cancers

Les marqueurs tumoraux ont été définis comme des molécules produites par les cellules cancéreuses ou induites sur les cellules normales par le cancer. Ainsi le changement de glycosylation des cellules cancéreuses peut être utilisé dans le diagnostic des cancers (Peracaula *et al.*, 2008). Pour certains cancers, les glycanes peuvent être détectés dans le sérum. C'est notamment le cas du marqueur CA125 (mucine avec de nombreux O-glycanes) pour les tissus ovariens (Kui Wong *et al.*, 2003) et de l'antigène sialyl Lewis<sup>a</sup> détecté lors du cancer du colon. De nombreuses études sont menées afin d'améliorer les techniques de diagnostic et de pronostic des cancers notamment en déterminant les biomarqueurs comme les glycanes présents à la surface des cellules cancéreuses. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, les biomarqueurs actuellement utilisés sont les glycoprotéines CA 15-3 et l'antigène carcinoembryonique (CEA). Même détecté conjointement avec le CEA, le CA 15-3 a une faible spécificité et sensibilité pour le cancer du sein. Ainsi ils ne sont utilisés que pour le pronostic et le suivi des patients (Duffy, 2006). D'autres marqueurs sont donc à l'étude comme par exemple le sialyl Lewis<sup>x</sup>. Des études par immunohistochimie (reconnaissance par des anticorps monoclonaux) ont montré que sLe<sup>x</sup> est exprimé plus fréquemment dans le cas de tumeurs avec métastases par rapport aux tumeurs sans métastases (Nakagoe *et al.*, 2002). Les N-glycanes présents dans le sérum de patients ont été clivés et marqués par du 2-aminobenzamide puis analysés par HPLC par détection par fluorescence (Royle *et al.*, 2008) couplée à des digestions par exoglycosidases et à la spectrométrie de masse (Abd Hamid *et al.*, 2008). Il a été observé une augmentation de la sialylation des formes tri- et tetra- antennées. La présence en plus grande proportion d'une forme triantennée trisialylée comprenant un fucose en  $\alpha 1,3$  d'un GlcNAc a également été mise en évidence. Cette forme constitue l'épitope sLe<sup>x</sup> (figure 8).



**Figure 8.** Représentation d'une forme tri-antennée présentant l'épitope sLe<sup>x</sup>.

Les patients atteints du cancer du sein présentent une quantité double de sLe<sup>x</sup> par rapport aux contrôles (patients sains). De plus le sLe<sup>x</sup> semble être un meilleur indicateur que la CA 15-3 pour la progression du cancer ainsi que pour déterminer la présence de métastases.

Il s'avère également que la *O*-glycosylation est différente selon les lignées cellulaires établies à partir de prélèvements de cellules tumorales. Par exemple, des cellules T47D de cancer du sein présentent en plus grande quantité des glycanes de type core 1 et moins de 5 % de core 2 alors que les cellules MCF-7 contiennent surtout des glycanes de type core 2 (83 %) (Müller et Hanisch, 2002). La détermination d'un biomarqueur d'un cancer est donc une tâche compliquée.

Cependant beaucoup de cancers n'ont pas de marqueurs dans le sérum. Il faut alors procéder directement à l'analyse des tissus. Les antigènes spécifiques peuvent alors être détectés par des lectines ou des anticorps monoclonaux.

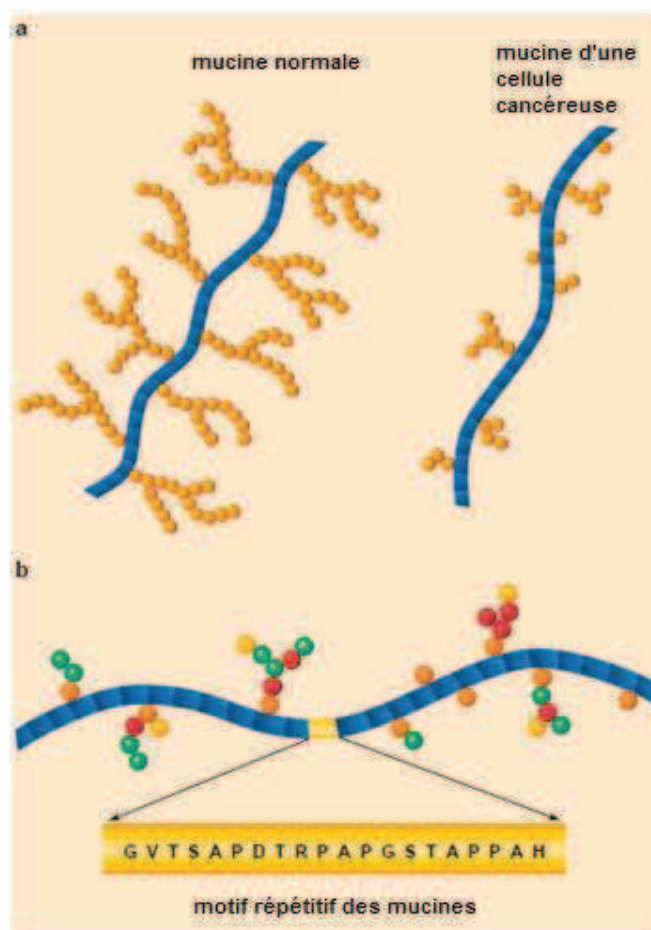
Les lectines sont des outils couramment utilisés en glycobiologie. Les lectines sont des protéines d'origine animale ou végétale spécifiques de certains motifs saccharidiques. Elles réagissent sur une grande variété de matériel biologique (cellules, tissus, fluides...). La détection des glycanes par les lectines peut s'effectuer par ELISA. Cette technique requiert l'utilisation de lectines marquées comme par exemple avec la biotine qui est révélée par son interaction avec l'avidine ou la streptavidine couplées à une enzyme comme la peroxydase ou la phosphatase alcaline (Duk *et al.*, 1994). Au cours de ces dernières années, d'autres méthodes se sont développées grâce aux micro-puces (Feizi *et al.*, 2003). Les glycanes sont par exemple immobilisés sur une surface solide et révélés par reconnaissance au moyen de lectines (Angeloni *et al.*, 2005). Ces méthodes permettent de

détecter des interactions sur des quantités très faibles de matériels grâce au grand nombre de ligands qui peuvent être utilisés et exposés à haute densité à la surface des puces. L'interaction entre les glycanes et les lectines peut également être mesurée par chromatographie d'affinité en utilisant des colonnes avec des lectines fixées (Kobata *et al.*, 1994). Les sucres sont ainsi caractérisés mais également ils peuvent être séparés en utilisant différentes colonnes. Les lectines marquées par un fluorophore peuvent également être employées pour caractériser les glycoconjugués présents à la surface des cellules comme par exemple lorsqu'elles sont utilisées en cytométrie en flux.

Des anticorps monoclonaux ont été produits en immunisant des souris notamment avec des cellules cancéreuses ou avec des glycanes couplés à une protéine porteuse. Par exemple, un anticorps monoclonal de l'antigène Tn a été produit en injectant à des souris des cellules humaines du cancer du colon (Numata *et al.*, 1990) et un autre en injectant à une souris des antigènes Tn synthétiques couplés à la SAB (Danussi *et al.*, 2009). Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés selon les mêmes techniques décrites pour les lectines afin d'identifier et de purifier des glycanes. Les anticorps peuvent être biotinylés, radiomarqués ou bien utilisés non marqués et révélés par des anticorps marqués reconnaissant les immunoglobulines de souris comme par exemple en immunofluorescence indirecte. Les anticorps monoclonaux sont également utilisés dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses ; c'est le cas par exemple du Rituximab pour les patients atteints d'un lymphome non Hodgkinien et ciblant l'antigène CD20 (protéine transmembranaire) (Molina, 2008). Plusieurs anticorps reconnaissant des glycanes sont actuellement en essais cliniques (par exemple un anti GD2, (Yu *et al.*, 2010)).

## II.2 Le cas des mucines

Dans le cas des cellules tumorales, on observe une modification de la glycosylation des mucines. C'est notamment le cas de MUC1. MUC1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau des cellules épithéliales et qui peut être sécrétée par les cellules. Cette protéine a été mise en évidence pour la première fois dans le lait maternel (Shimizu et Yamauchi, 1982). Elle est composée d'un motif répétitif de 20 acides aminés : GVTSPDTRPAGSTAPPAH et présente de nombreux sites de glycosylation. MUC1 est présente sur une grande variété de cellules épithéliales normales (poumon, sein, pancréas, estomac, colon, rein, prostate) mais également sur les cellules cancéreuses du sein, des ovaires, du pancréas, de l'endomètre, du colon, du poumon et de la prostate (Zhang *et al.*, 1998) où elle est surexprimée et sa glycosylation est altérée (figure 9).



**Figure 9.** a Comparaison de la glycosylation de MUC1 d'une cellule normale (à gauche) avec celle d'une cellule tumorale (à droite) b Représentation de MUC1 et de sa séquence répétitive d'acides aminés (Agrawal *et al.*, 1998).

Dans le cas des mucines de cellules tumorales, les glycanes sont présents en moins grande quantité le long de la protéine. De plus ils sont tronqués par rapport à ceux d'une cellule saine et plus sialylés par rapport à ceux des mucines d'une cellule saine. Cette sialylation précoce conduit à la formation de glycanes plus courts. Suite à cette glycosylation altérée, des séquences de la protéine ainsi que les premiers sucres qui composent les glycanes (par exemple, la GalNAc) sont plus exposés que sur une mucine d'une cellule normale et donc plus accessibles au système immunitaire.

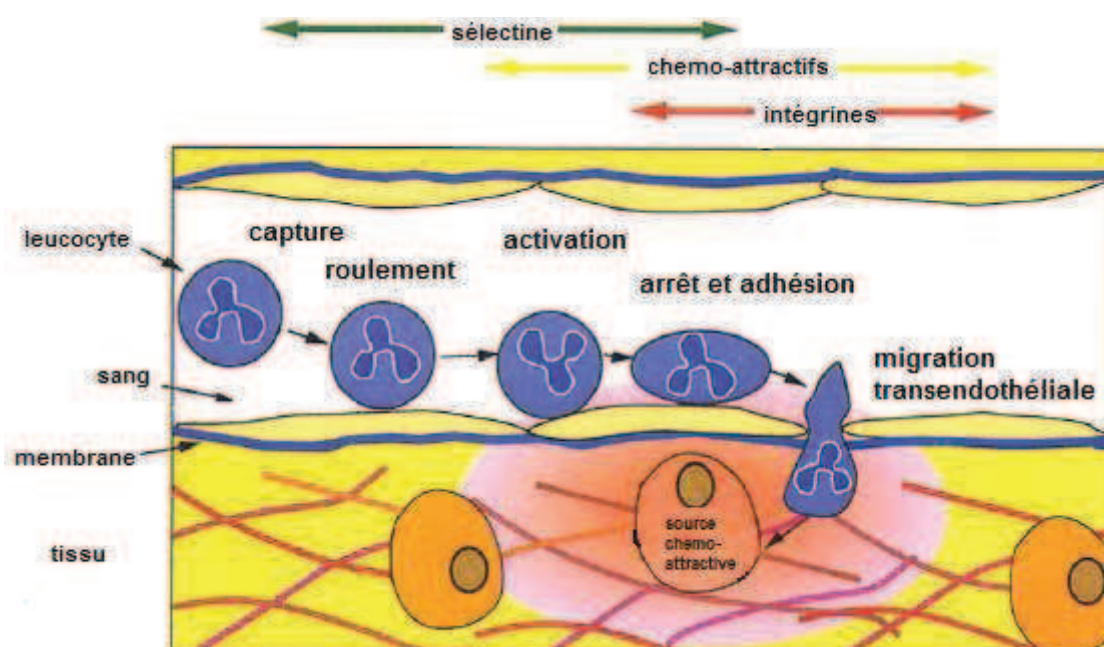
La O-glycosylation de MUC1 issu de la purification de sérums de patient atteints de cancers avancés du sein a été étudiée (Storr *et al.*, 2008). Les mucines sont purifiées à partir des sérums par chromatographie d'affinité et d'exclusion puis les O-glycanes sont libérés par hydrazinolyse des mucines. Les glycanes sont ensuite marqués avec du 2-aminobenzamide et analysés par HPLC comme décrit précédemment (Royle *et al.*, 2008). Ainsi les MUC1 des sérums de cancers avancés du sein présentent des glycanes de type core

1 (83 %), dont des structures présentant des acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-8 (8.8 % des core 1), des antigènes TF (GalB1-3GalNAc) (14.3 % des core 1) et des glycanes de type core 2 (17%). Les glycanes de ces MUC sont donc plus courts que ceux des MUC d'une cellule saine (majorité de core 2) ; ils sont hautement sialylés (80.5 % des structures glycaniques). Une importante quantité d'antigènes TF a aussi été détectée. Or ils participent à l'adhérence des cellules cancéreuses entre elles ou avec des cellules endothéliales (voir II.1.2).

## II.3 Autres maladies

### II.3.1 Inflammation

Les maladies inflammatoires telles que l'arthrose, le psoriasis ou l'asthme sont caractérisées par un recrutement de leucocytes dans les tissus affectés. L'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et la migration des leucocytes dans les tissus inflammés commence par leur adhérence au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Cette interaction est régulée par les sélectines (E-, P- et L- sélectines). Les sélectines participent à la capture des leucocytes, leurs « roulements » et leurs ralentissements au niveau des cellules endothéliales (figure 10).



*Figure 10. Etape du recrutement des leucocytes (Springer, 1994)*

Les cellules endothéliales des tissus non inflammés n'expriment pas les glycanes sLe<sup>x</sup> et sulfo sLe<sup>x</sup> contrairement à celles des organes inflammés où ces glycanes sont

surexprimés. Ces épitopes recouvrent notamment les ligands des L-sélectines de manière spécifique selon les organes (Renkonen *et al.*, 2002). Ainsi ces glycanes pourraient être utilisés pour inhiber spécifiquement l'adhérence des leucocytes.

### II.3.2 Autres maladies

La surface du virus du sida est recouverte de sucres ; elle est notamment riche en Man terminaux. Ces glycanes sont produits par la cellule hôte elle-même ce qui rend le virus « invisible » pour le système immunitaire. Des lectines spécifiques des Man ont été étudiées comme possibles agents thérapeutiques. Une autre stratégie consiste à administrer un médicament afin d'inhiber la synthèse des glycanes du virus et ainsi d'empêcher sa fixation au niveau de la cellule hôte (Oppenheimer *et al.*, 2008).

L'altération de la glycosylation de protéines par la liaison sur une sérine ou thréonine de la  $\beta$ -N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) se retrouve dans certains cas de diabète et de neurodégénération comme la maladie d'Alzheimer. Ces protéines sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires et induisent une résistance à l'insuline, une toxicité du glucose, une altération de la transcription et de la signalisation. Comprendre comment l'altération de la glycosylation conduit à ces phénomènes permettrait de trouver de nouveaux traitements et d'améliorer le diagnostic de ces maladies.

Les glycanes sont donc des cibles de choix pour différentes stratégies thérapeutiques. En effet ils interviennent lors de nombreuses maladies tel que le cancer où ils sont surexprimés et n'induisent pas de réponse immune ou encore au niveau de sites d'inflammation. Ils sont donc des biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic de ces maladies. De nombreuses études ont été conduites pour identifier des glycanes spécifiques des divers états pathologiques ainsi que des moyens efficaces de détection et de caractérisation de ces glycanes. Les antigènes glucidiques entrent également de plus en plus dans la composition de vaccins anti-tumoraux expérimentaux.

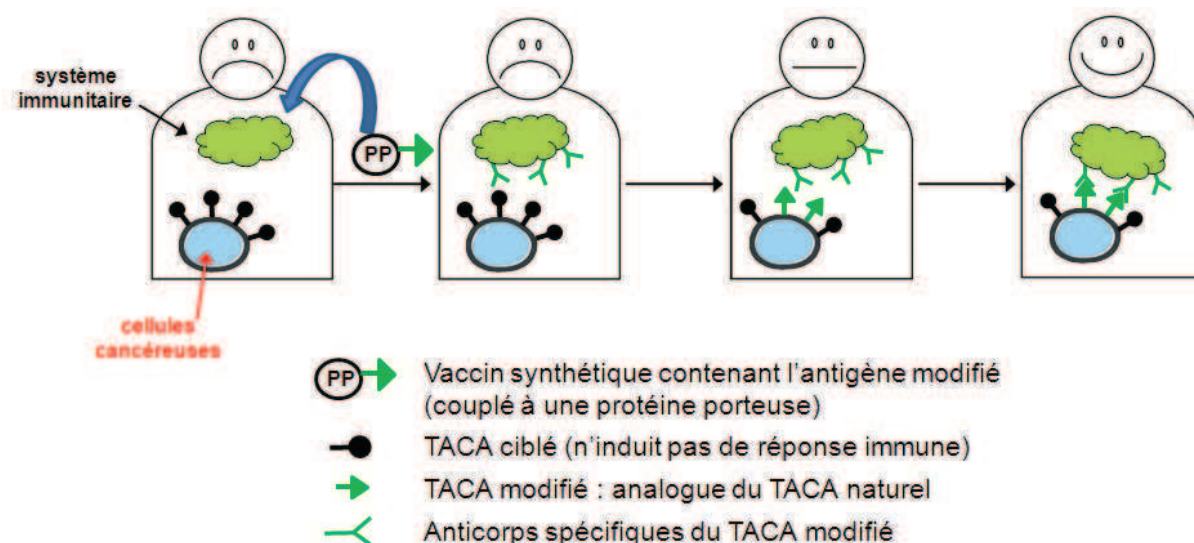
### III. Utilisation thérapeutique de sucres modifiés

#### III.1 Stratégie de vaccination anti-tumorale

Du fait de l'altération de la glycosylation des cellules cancéreuses par rapport à une cellule saine, il est possible de cibler les cellules cancéreuses à l'aide de ces antigènes tumoraux anormaux. Ces antigènes (TACA) n'induisent pas de réponse immune (phénomène de tolérance) ainsi les différentes stratégies de vaccination consistent à contourner ce phénomène d'immunotolérance afin d'avoir une activation du système immunitaire et notamment la production d'anticorps.

Il existe deux stratégies de vaccination :

➤ Immunothérapie active

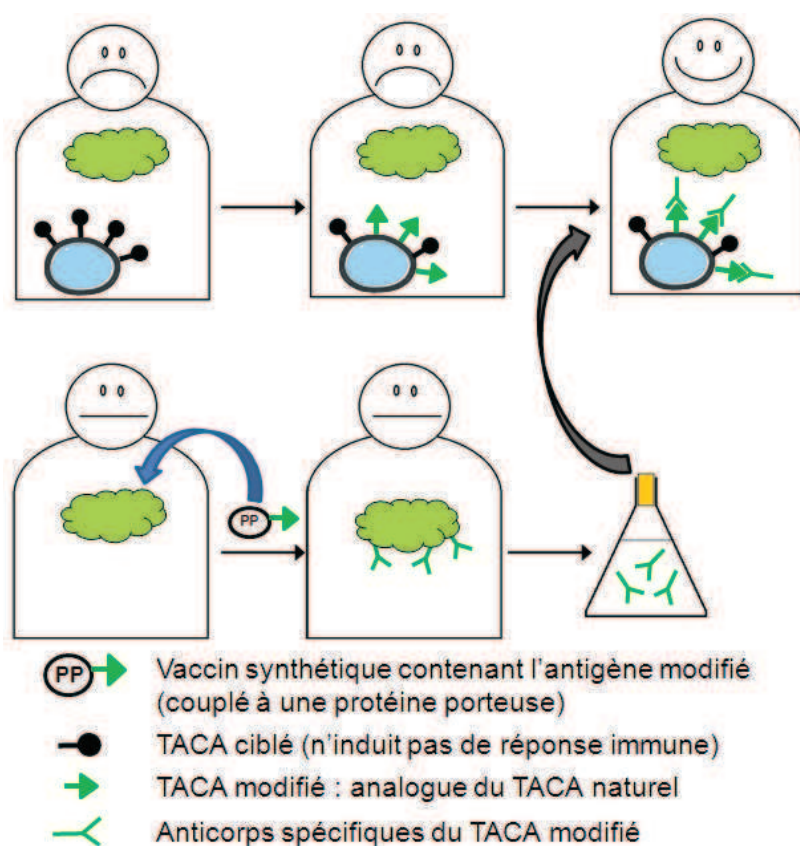


**Figure 11.** Représentation schématique de la stratégie de vaccination dite active d'après (Guo et Wang, 2009).

Cette stratégie consiste à injecter à un patient un vaccin contenant un dérivé artificiel d'un antigène naturel (comme par exemple un antigène saccharidique). Suite à cette injection, le système immunitaire est activé et des anticorps spécifiques de cet antigène modifié sont produits. Les cellules tumorales peuvent ensuite être marquées par cet antigène artificiel. Pour cela le patient est traité avec un saccharide précurseur de l'antigène et modifié afin d'initier l'expression de l'antigène artificiel en même temps que le naturel à la surface des cellules. Les cellules tumorales ont un métabolisme plus actif

que celui des cellules saines ainsi l'antigène modifié sera exprimé préférentiellement à la surface des cellules tumorales. On peut alors s'attendre à l'élimination de la tumeur par réponse immune spécifique vis-à-vis de l'antigène modifié. Pour que cette approche soit efficace, le sucre modifié devrait induire une réponse immune cellulaire, ce qui est très rare pour les antigènes glucidiques (Cunto-Amesty *et al.*, 2003). Cependant il a été montré que la présence d'anticorps anti-glycanes est un meilleur facteur de pronostic pour plusieurs types de cancers (MacLean *et al.*, 1996).

➤ Immunothérapie passive



**Figure 12.** Représentation schématique de la stratégie de vaccination dite passive d'après (Guo *et al.*, 2009).

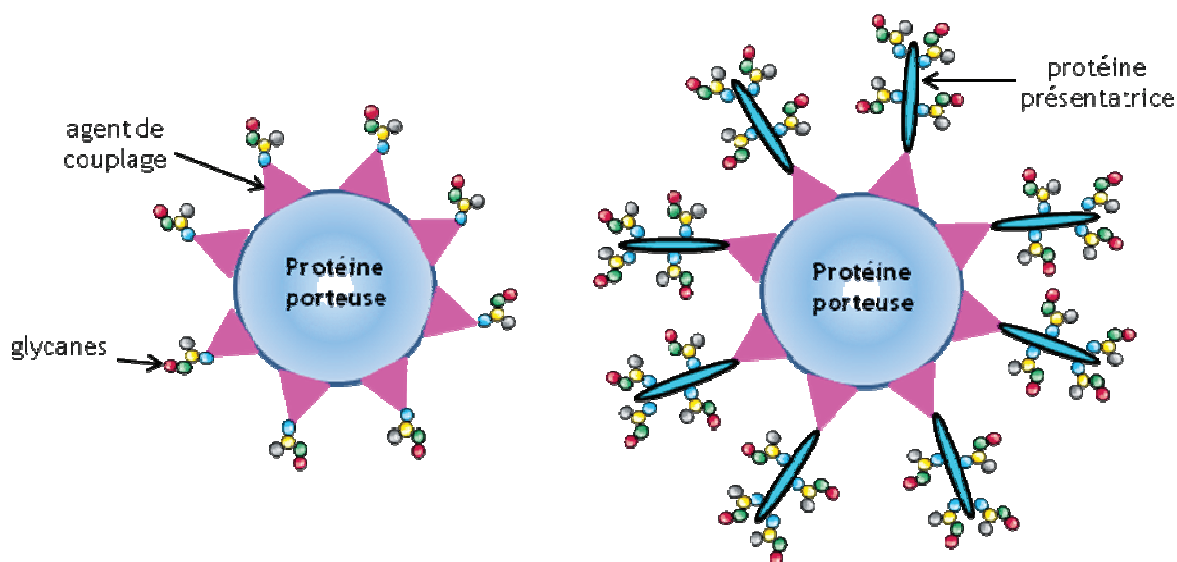
L'immunothérapie passive consiste à traiter le patient avec un saccharide modifié afin de marquer les cellules tumorales par cet antigène artificiel. Les anticorps spécifiques seront produits contre les sucres modifiés par l'activation du système immunitaire d'un individu sain (ou plus souvent dans la souris). Des anticorps monoclonaux seront obtenus, humanisés si besoin, produits en grande quantité puis injectés au patient. Ces anticorps

ciblant les sucres modifiés présents sur les cellules tumorales, ces dernières seront éliminées par les cellules effectrices comme les NK et les macrophages.

Ces 2 stratégies de vaccination reposent sur 2 hypothèses : concevoir un vaccin capable d'activer efficacement le système immunitaire et trouver un précurseur métabolisable par les cellules cancéreuses afin d'obtenir une expression de l'antigène tumoral modifié à leur surface.

### III.2 Synthèse d'antigènes pour une vaccination

Des glycoconjugués sont utilisés dans la vaccination anti-tumorale comme antigènes. Cette stratégie de vaccination repose sur l'utilisation d'un antigène saccharidique peu immunogène couplé sur une protéine porteuse afin d'induire une réponse immune. Dans la préparation d'un vaccin, la présentation de l'antigène au système immunitaire est importante. Les antigènes saccharidiques ne peuvent être utilisés directement comme antigènes modifiés mais ils doivent être couplés à une protéine porteuse afin d'induire une réponse immune plus forte (figure 13).



**Figure 13.** Représentation schématique de construction de vaccins à partir de glycanes.

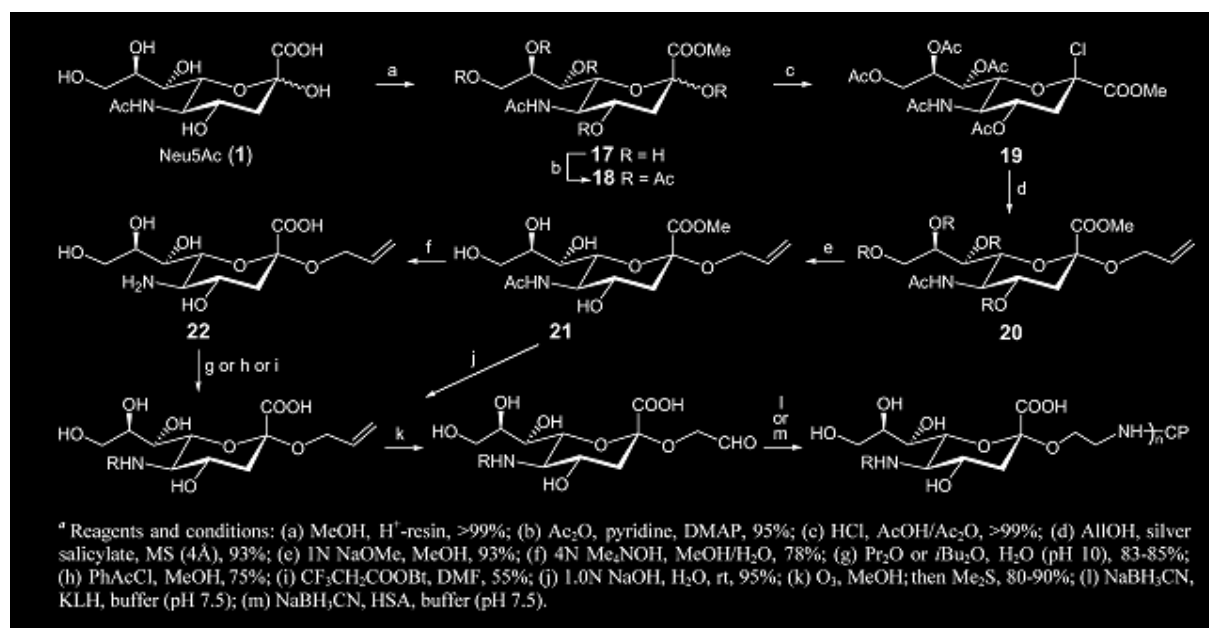
En effet la densité de l'haptène ainsi que son orientation modifient la réponse immune. Il a été montré que lors du couplage d'un peptide immunogène sur une protéine porteuse, la réponse immune était meilleure avec l'augmentation du taux de conjugaison du peptide sur la protéine (Pedersen *et al.*, 2006). De plus le taux d'anticorps est plus

élevé dans le cas où les peptides ont été conjugués en position centrale de la séquence peptidique de la protéine porteuse plutôt qu'à proximité des extrémités N-et C-terminales, sans changer l'affinité. Dans une étude récente, les peptides portant l'antigène Tn ont été conjugués à différents taux sur une protéine porteuse et injectés à des souris (Li *et al.*, 2010). La densité de l'haptène n'a pas globalement modifié la réponse immune puisque le taux d'anticorps IgG et IgM est identique. Cependant le spectre des anticorps produits est différent. Les anticorps produits après injection de la protéine à haute densité de sucre reconnaissent une plus grande variété de peptides présentant l'antigène Tn qu'il soit lié à une sérine ou à une thréonine, sous une forme isolée ou en cluster comme lorsqu'il est présent sur les cellules tumorales. En revanche les anticorps produits après injection de la protéine à faible densité de l'haptène sont plus spécifiques.

Un plus grand nombre d'antigènes ne semble pas toujours être plus efficace pour une vaccination anti-tumorale. En effet la production d'anticorps a été comparée après injection d'antigène Tn en cluster (3 Tn sur 3 Thr adjacentes couplées à KLH) ou injection d'antigène Tn sur MUC1 glycosylé sur 5 sites non adjacents (Kagan *et al.*, 2005). Dans le cas de l'antigène Tn présenté en cluster, la quantité de sucre injectée est plus faible mais il est présent dans des zones de densité plus grande ce qui paraît primer pour la production d'anticorps reconnaissant des cellules cancéreuses. Ce résultat n'est pas surprenant car parmi les antigènes présents sur les cellules cancéreuses, on trouve des antigènes Tn en cluster.

### III.2.1 Couplage d'un sucre modifié sur une protéine porteuse

Une fois le sucre modifié synthétisé, il est couplé par une réaction chimique sur une protéine porteuse. Différents agents de liaison et différentes techniques de couplage ont été développés afin de faciliter la conjugaison entre un sucre et une protéine (Danishefsky et Allen, 2000). Cependant le couplage reste délicat car il nécessite souvent plusieurs étapes de synthèse. De plus il est souvent nécessaire de protéger les différents groupements hydroxyles présents sur les sucres, avant d'effectuer le couplage, ce qui rajoute des étapes (figure 14).



**Figure 14.** Exemple de couplage chimique d'acides N-acétyl neuraminiques sur KLH ou HSA (Chefalo et al., 2004).

### III.2.2 Couplage d'un glycoconjugué sur une protéine porteuse

Cette stratégie est souvent moins complexe. En effet dans un premier temps, un peptide ou protéine est glycosylé. Le glycoconjugué obtenu pourra être lié à la protéine porteuse à l'aide d'un agent de couplage. Il existe de nombreux agents de couplage commerciaux avec différents groupes réactifs selon le groupement fonctionnel visé. Ces agents de couplage auront différentes longueurs, différentes propriétés (solubilité, hydrophobicité, immunogénicité...) (tableau 3).

| Groupement fonctionnel visé        | Groupe réactif de l'agent de couplage     |
|------------------------------------|-------------------------------------------|
| Carboxyl (directement sur l'amine) | Carbodiimide (EDC)                        |
| Amine                              | NHS ester<br>Imidoester                   |
| Sulfhydryl                         | Maleimide<br>Haloacetyl<br>Pyridylsulfide |
| Aldéhyde                           | Hydrazide                                 |

**Tableau 3.** Agents de couplage couramment utilisés pour le couplage de deux protéines.

## III.2.3 Utilisation de la Keyhole limpet hemocyanin (KLH)

KLH est fréquemment employée comme protéine porteuse notamment pour son pouvoir immunostimulant. La KLH est une protéine de haut poids moléculaire extraite d'un mollusque marin, la patelle *Megathura crenulata*. Elle existe sous 2 isoformes : KLH1 et KLH2 avec différentes propriétés électrostatiques et composées chacune de 8 sous-unités d'environ 50 kDa.

Il a été démontré que la conjugaison sur KLH permet d'avoir une meilleure réponse immune en comparaison avec d'autres protéines porteuses. C'est notamment le cas de vaccins constitués de  $G_{D3}$  couplé à différentes protéines (Helling *et al.*, 1994). La réponse immune a été comparée après l'immunisation de souris à l'aide d'un vaccin composé de  $G_{D3}$  seul ou couplé soit sur la KLH, soit la BSA, soit la protéine de la membrane externe (MPE) de *Neisseria meningitidis*, soit MAP YAL-IV 294-I (contenant 4 motifs répétitifs d'un épitope T de la malaria) ou soit une poly-L-lysine. Après dosage par ELISA des anticorps, les résultats suivants ont été obtenus (tableau 4).

| Vaccin + QS-21         | Nbre de souris immunisées | GD3/protéine (en poids) | Nbre. de souris par titres d'IgG<br>Nbre. de souris par titres d'IgM |       |      |        |        |     |     |     |        |        |        |        |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------|------|--------|--------|-----|-----|-----|--------|--------|--------|--------|
|                        |                           |                         | titre                                                                | 10240 | 5120 | 2560   | 1280   | 640 | 320 | 160 | 80     | 40     | 20     | 0      |
| $G_{D3}$               | 5                         |                         |                                                                      |       |      |        |        |     |     |     |        |        | 3      | 5<br>2 |
| $G_{D3}$ -KLH          | 14                        | 0,69                    |                                                                      | 2     | 2    | 3<br>1 | 2<br>2 | 1   | 3   | 2   | 2<br>3 | 2      | 1      | 1      |
| $G_{D3}$ -BSA          | 15                        | 0,77                    |                                                                      |       |      | 2      |        |     | 2   | 1   | 2<br>2 | 4<br>2 | 2<br>7 | 2<br>4 |
| $G_{D3}$ -MPE          | 15                        | 0,93                    |                                                                      |       |      | 1      |        |     |     |     | 4<br>4 |        | 3      | 7      |
| $G_{D3}$ -MAP          | 10                        | 1,0                     |                                                                      |       |      |        | 1      |     | 2   | 7   | 4      | 1      |        |        |
| $G_{D3}$ -Polyl lysine | 10                        | ND                      |                                                                      |       |      |        |        |     |     |     |        |        |        | 10     |

**Tableau 3.** Réponse immune après immunisation par différents vaccins constitués de  $G_{D3}$  couplé à diverses protéines (titres définis par la plus grande dilution pour avoir une absorbance de 0,1 à 405 nm, en ELISA avec le substrat de la peroxydase).

Le taux d'IgG et d'IgM et le nombre des souris répondeuses sont plus importants dans le cas du vaccin avec KLH malgré un taux de couplage légèrement plus faible sur la KLH que sur les autres protéines.

De même, des injections d'un vaccin composé de MUC1 glycosylé par la GalNAc (antigène Tn) couplé à différentes protéines porteuses ont été réalisées (Kagan *et al.*, 2005). Dans cette étude, la KLH a été comparée à la BSA ainsi qu'à un polymère (polystyrène). Après ELISA sur les sérums obtenus, il a été observé une production plus importante d'IgG dans le cas des vaccins avec KLH.

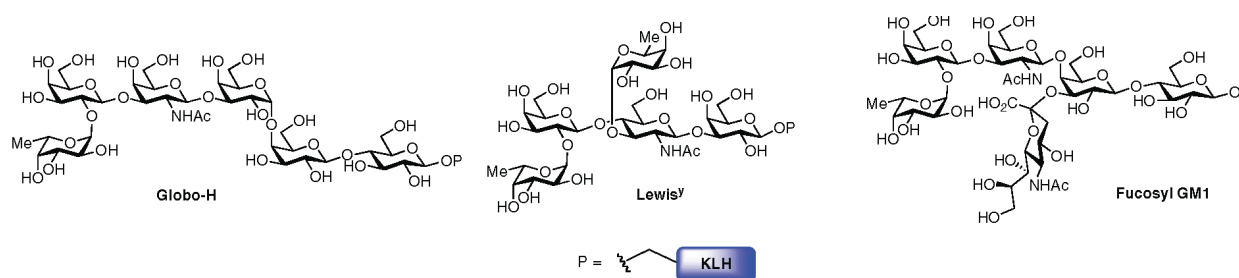
La conjugaison sur KLH permet également d'obtenir des anticorps spécifiques de l'antigène. En effet après injections d'un vaccin composé de Globo-H lié à la KLH, les anticorps produits sont spécifiques de Globo-H et des structures dérivées comme le galactosyl-globoside ou le globoside (Wang *et al.*, 2000). De même des injections de GD3 lactone couplées à la KLH conduisent à une réponse IgG spécifique de GD3. Les anticorps ne reconnaissent pas les autres gangliosides GD2, GM1, GM2, GM3 et FGM1 (Ragupathi *et al.*, 2000).

La KLH est ainsi une protéine porteuse fréquemment utilisée dans les stratégies de vaccination anti tumorale. Elle permet d'augmenter la réponse immune tout en produisant des anticorps spécifiques de la structure antigénique couplée à la protéine.

### III.3 Etude immunologique après vaccination

#### III.3.1 Vaccin semi-synthétique d'antigènes saccharidiques tumoraux

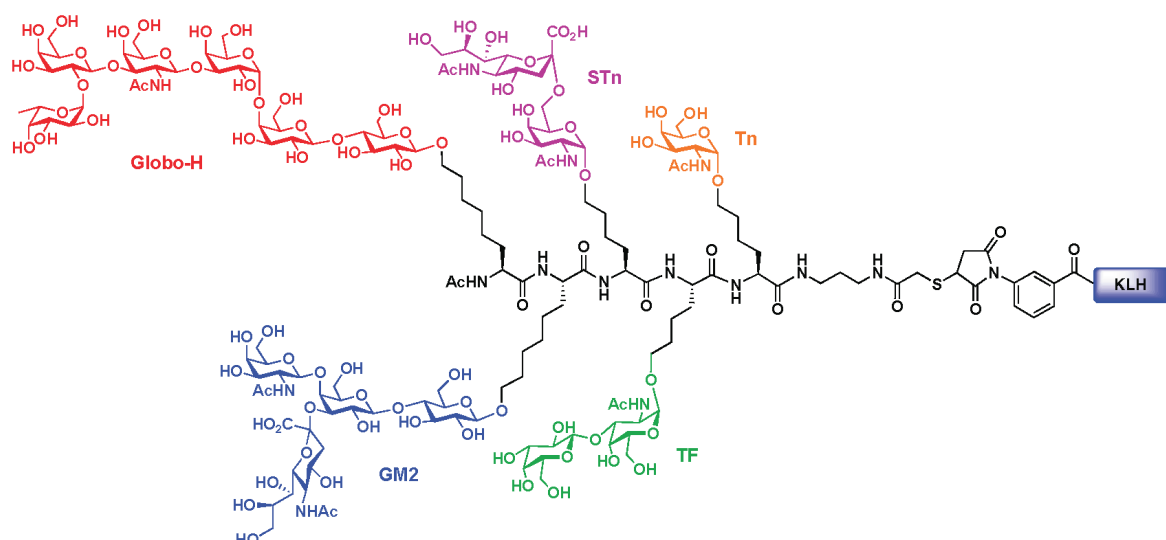
Cette stratégie de vaccination consiste à coupler sur une protéine porteuse différents antigènes tumoraux. Ainsi l'équipe de Danishefsky a testé la vaccination avec différentes constructions comprenant une protéine porteuse immunogène, la KLH, sur laquelle a été couplé un antigène saccharidique. L'équipe a testé différents antigènes tels que le Globo-H, le fucosyl GM<sub>1</sub> et Lewis<sup>x</sup> (figure 15).



**Figure 15.** Représentation des antigènes tumoraux utilisés par Danishefsky et son équipe (Zhu *et al.*, 2009).

De bons résultats ont été obtenus avec le vaccin contenant Globo-H chez des patients atteints du cancer de la prostate (Slovin *et al.*, 1999). Tous les patients immunisés montrent une augmentation de la réponse IgM et le vaccin ne présente pas de cytotoxicité. Cependant, même après injection du vaccin avec Globo-H, les patients expriment toujours un niveau croissant de PSA (Prostate Specific Antigen), le bio-marqueur spécifique du cancer de la prostate. Mais après 3 mois certains patients ont présenté des taux plus faibles de PSA suggérant une efficacité du vaccin après complétion du traitement. Le même type de vaccin a été utilisé pour des patients atteints d'un cancer métastatique du sein avec trois autres méthodes de couplage (Gilewski *et al.*, 2001). Une bonne réponse immune a été obtenue indépendamment des différentes formulations. Un vaccin avec l'antigène Lewis<sup>x</sup> couplé à la KLH démontre aussi une bonne réponse immune avec une faible cytotoxicité sur des patientes souffrants d'un cancer des ovaires (Sabbatini *et al.*, 2000). Le même type de résultats a été obtenu avec des patients touchés par un cancer du poulmon à petites cellules qui ont reçu un vaccin comportant du fucosyl GM1 (Krug, Ragupathi, Hood, *et al.*, 2004).

Néanmoins, l'utilisation d'un seul type d'antigène sur le vaccin semble avoir un impact plutôt limité au niveau clinique. Il est possible de créer un vaccin polyvalent en fixant différents antigènes sur une protéine porteuse. C'est pourquoi l'équipe de Danishefsky a réalisé la synthèse d'un vaccin multi-antigénique avec pas moins de 5 antigènes différents (figure 16).



**Figure 16.** Exemple de structure d'un vaccin multi-antigénique (Zhu et al., 2009).

Les antigènes présents sur ce vaccin sont tous des antigènes présents à la surface des cellules saines. Ils sont surexprimés lors de certains cancers mais n'induisent pas de réponse immune car ils sont reconnus en tant qu'antigène du « soi ».

Après injections à des souris, la réponse immune a été étudiée par test ELISA. La production des anticorps IgM et IgG spécifiques à chaque antigène présenté par le vaccin a été mesurée (tableau 5a). La production de ces anticorps a également été testée sur des cellules MCF-7 de cancer du sein par FACS (tableau 5b).

**a**

| Mouse #       | Globo-H<br>Ceramide |     | GM2<br>Ceramide |     | OSM<br>for sTn |      | dPSM<br>for TF |     | dOSM<br>for Tn |     |
|---------------|---------------------|-----|-----------------|-----|----------------|------|----------------|-----|----------------|-----|
|               | IgG                 | IgM | IgG             | IgM | IgG            | IgM  | IgG            | IgM | IgG            | IgM |
| Pre-Serum     | 0                   | 0   | 0               | 0   | 0              | 0    | 0              | 160 | 0              | 0   |
| 1             | 160                 | 160 | 160             | 0   | 400            | 320  | 400            | 400 | 800            | 0   |
| 2             | 640                 | 160 | 640             | 0   | 1600           | 40   | 400            | 400 | 1600           | 0   |
| 3             | 640                 | 160 | 640             | 0   | 800            | 320  | 200            | 100 | 6400           | 200 |
| 4             | 640                 | 640 | 2560            | 0   | 1600           | 2560 | 1600           | 800 | 3200           | 400 |
| 5             | 640                 | 160 | 640             | 0   | 1600           | 20   | 1600           | 800 | 1600           | 400 |
| <b>Median</b> | 640                 | 160 | 640             | 0   | 1600           | 320  | 800            | 400 | 1600           | 200 |

b

| Mouse #   | Post-Vaccination Serum<br>MCF-7 Cells (Breast Cancer) |     |       |     | Boost-Vaccination Serum<br>MCF-7 Cells (Breast Cancer) |     |       |     |
|-----------|-------------------------------------------------------|-----|-------|-----|--------------------------------------------------------|-----|-------|-----|
|           | IgM                                                   |     | IgG   |     | IgM                                                    |     | IgG   |     |
|           | % Pos                                                 | MFI | % Pos | MFI | % Pos                                                  | MFI | % Pos | MFI |
| Pre-Serum | 10%                                                   | 85  | 10%   | 64  | 10%                                                    | 85  | 10%   | 64  |
| 1         | 53%                                                   | 302 | 14%   | 87  | 70%                                                    | 561 | 8%    | 55  |
| 2         | 33%                                                   | 203 | 8%    | 78  | 72%                                                    | 486 | 1%    | 33  |
| 3         | 36%                                                   | 313 | 16%   | 245 | 72%                                                    | 897 | 3%    | 41  |
| 4         | 49%                                                   | 321 | 8%    | 52  | 51%                                                    | 424 | 3%    | 20  |
| 5         | 34%                                                   | 195 | 10%   | 55  | 56%                                                    | 450 | 10%   | 68  |
| Median    | 36%                                                   | 302 | 10%   | 78  | 70%                                                    | 486 | 3%    | 41  |

**Tableau 5.** Dosage des anticorps IgM et IgG présents dans les antisérums de souris avant et après injections. Les antisérums sont testés par ELISA sur les différents antigènes qui constituent le vaccin (titres définis par la plus grande dilution pour avoir une absorbance de 0,1) (a) ainsi que sur des cellules cancéreuses du sein par FACS (MCF-7, antisérums dilués 1/200) (b).

Après injections du vaccin pentavalent, les antisérums des souris présentent des doses d'anticorps significatives pour chacun des antigènes présents sur le vaccin. L'effet observé pour les vaccins monovalents est donc préservé même lors d'un vaccin à la structure plus complexe. Les sérums ont également été testés sur des cellules cancéreuses MCF-7. Cette fois-ci la réponse immune est presque uniquement composée d'IgM (36 %). Le vaccin permet même de faire un rappel et d'augmenter ainsi le taux d'IgM (70 %).

L'intérêt de ce vaccin est de pouvoir cibler avec efficacité plusieurs antigènes en même temps et ainsi d'augmenter la réponse immune. Il peut également être utilisé pour différents cancers.

D'autres vaccins semi-synthétiques à partir d'antigènes saccharidiques tumoraux ont été utilisés afin d'induire une production d'anticorps (tableau 6).

| Antigène utilisé / référence                                                    | Protéine porteuse / adjuvant | Tissu visé | Réponse immune                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GD <sub>3</sub> et GD <sub>3</sub> -lactone<br>(Ragupathi <i>et al.</i> , 2000) | KLH<br>QS21                  | Mélanome   | Faible production d'anticorps chez les patients dans le cas de GD <sub>3</sub><br><br>Production d'IgG et d'IgM avec GD <sub>3</sub> -L qui reconnaissent GD <sub>3</sub> et GD <sub>3</sub> -L en ELISA et sur des cellules de mélanome (SK-MEL-28) qui expriment GD <sub>3</sub>                                                                               |
| GM2<br>(Chapman <i>et al.</i> , 2000)                                           | KLH<br>QS21                  | Mélanome   | 88 % des patients vaccinés développent une réponse IgM, 71 % pour IgG<br><br>Une dose de 1 µg n'est pas suffisante<br>50 % des patients ont des IgM qui reconnaissent les cellules GM2 positive<br><br>Au moins 50 % des patients ont une réponse anti-GM2 après 5,5 mois                                                                                        |
| sLe <sup>a</sup><br>(Ragupathi <i>et al.</i> , 2009)                            | KLH<br>GPI-0100              |            | Bonne réponse immune après injection de sLe <sup>a</sup> -KLH : IgG (1/51200) et IgM (1/1280) aux souris<br><br>Spécificité des anticorps pour sLe <sup>a</sup><br><br>Bonne réactivité sur des cellules cancéreuses ovariennes (sLe <sup>a</sup> pos.)<br><br>Pas d'augmentation de la réponse immune vis-à-vis de cellules du mélanome (sLe <sup>a</sup> neg.) |
| sTn<br>sTn(cluster)<br>(Zhang <i>et al.</i> , 1995)                             | KLH<br>QS-21                 |            | Production faible d'IgM mais forte réponse IgG avec les 2 vaccins contre les épitopes synthétiques et contre les sTN exprimés sur OSM et des cellules tumorales humaines                                                                                                                                                                                         |

**Tableau 6.** Exemples de quelques vaccins semi-synthétiques composés d'antigènes tumoraux et les résultats obtenus.

Le couplage d'antigènes tumoraux sur une protéine porteuse immunogène a permis d'obtenir une bonne et durable réponse immunitaire. L'immunisation de souris par ces vaccins a conduit à la production d'anticorps spécifiques de l'antigène utilisé qui présentent une bonne réactivité vis-à vis de cellules cancéreuses. Néanmoins la

construction d'un vaccin multi-antigénique semble plus prometteuse pour une application clinique afin de cibler différentes populations et plusieurs types de cancer.

### III.3.2 Vaccin à l'aide d'un peptide

Des peptides peuvent également être utilisés en tant que vaccins. Il s'agit principalement de MUC1, une mucine membranaire composée d'unités répétitives de 20 aminoacides. En effet MUC1 est surexprimé au niveau des cellules cancéreuses et sa glycosylation est altérée laissant le peptide plus accessible au système immunitaire. Néanmoins le glycopeptide MUC1 seul n'induit pas de réponse immune. Une stimulation est nécessaire.

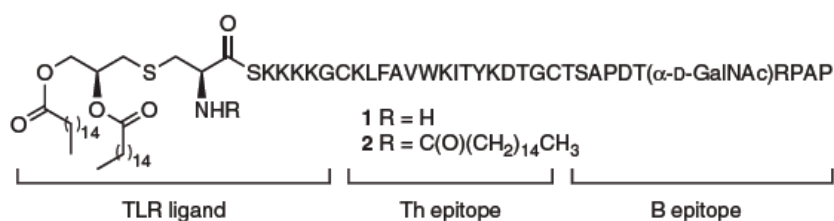
Tout comme les antigènes tumoraux, MUC1 peut être facilement couplé à une protéine porteuse immunogène telle que la KLH. Ainsi la vaccination de souris par injection de MUC1 couplé à la KLH en présence de QS-21 comme adjuvant (saponine extraite de l'écorce de l'arbre *Quillaja saponaria*) a donné de forts titres en anticorps. Ces anticorps reconnaissent MUC1 conjugué sur un peptide ainsi que MUC1 exprimé à la surface de cellules cancéreuses (Zhang *et al.*, 1996). Suite à ces résultats, un test clinique a été mis en place sur des patients ayant un cancer du sein mais pas de symptôme clinique de la maladie (Gilewski *et al.*, 2000). Après plusieurs injections, le vaccin n'a pas engendré de toxicité et semble être bien toléré. Une production significative d'anticorps (IgG et IgM) a été observée mais pour la plupart des patients le taux d'anticorps diminue avec le temps. De plus l'activation des lymphocytes T n'a pas pu être mise en évidence. Les IgM produites reconnaissent les MUC1 exprimés par des cellules MCF-7 contrairement aux IgG. Par des tests d'inhibition, il a été montré que les anticorps se lient à l'épitope APDTRPA de MUC1. Ainsi la réponse immunitaire peut être augmentée avec un vaccin présentant plusieurs fois cet épitope. Il semble également que MUC1 glycosylé pourrait être un meilleur vaccin que le peptide nu (Ryan *et al.*, 2009). En effet l'injection de MUC1 présentant l'antigène Tn active les cellules T CD4 spécifiques de MUC1.

Des MUC1 glycosylés portant les antigènes Tn ou sTn ((MUC1)<sub>60</sub>Tn<sub>15</sub> ou (MUC1)<sub>60</sub>sTn<sub>15</sub>) induisent une forte réponse immune chez les souris (Sørensen *et al.*, 2006). De plus les anticorps produits sont spécifiques de MUC1 (pas de réactivité avec des protéines autres que MUC1 glycosylés par Tn ou sTn). Néanmoins la glycosylation de MUC1 peut aussi avoir un effet inverse (Westerlind *et al.*, 2008). En effet après injection de MUC1 non glycosylé, mono, di ou tri glycosylé, il a été observé une diminution de la production d'anticorps lorsque le peptide est tri-glycosylé notamment si le motif PDTRP est glycosylé. De plus les anticorps induits par le vaccin mono-glycosylé possèdent une meilleure affinité vis-à-vis de

l'épitope MUC1 glycosylé. Dans ce cas également, la densité de l'antigène injecté semble influencer la réponse immune. Cependant cette étude montre des résultats différents de ceux obtenus par l'équipe de Livingston (Kagan *et al.*, 2005) où l'antigène Tn présenté en cluster donc avec une plus grande densité donne une meilleure réponse immune. Mais l'étude de Westerlind n'a été réalisée que sur 3 souris par type de vaccin ce qui est plutôt faible quand on connaît la variabilité de réponse qui peut exister entre souris.

La densité de GalNAc fixés sur MUC1 semble également avoir une influence sur la présentation au CMH (ensemble de gènes codant pour des protéines de membrane présentant les fragments peptidiques reconnus par les cellules T) et l'activation ou non de cellules T (Singh *et al.*, 2010). Une plus faible glycosylation de MUC1 apparaît meilleure pour l'induction d'une forte réponse immune. Dans le cas de peptides fortement glycosylés, le complexe CMH de classe I ne serait pas activé (Hiltbold *et al.*, 2003), (Stepensky *et al.*, 2006).

L'équipe de Boons a développé un vaccin synthétique composé de 3 parties : l'épitope B de MUC1, un épitope des cellules T et un ligand TLR (rôle d'adjuvant) (figure 17).



**Figure 17.** Structure du vaccin synthétique (Ingale *et al.*, 2007).

Après immunisation des souris, les antisérums ont été dosés par ELISA contre MUC1 (tableau 7).

| Immunisation      | IgG total | IgG1    | IgG2a   | IgG2b  | IgG3    | IgM   |
|-------------------|-----------|---------|---------|--------|---------|-------|
| <b>1</b>          | 20 900    | 66 900  | 700     | 900    | 7 300   | 1 400 |
| <b>1 et QS-21</b> | 30 200    | 113 100 | 23 000  | 6 600  | 17 800  | 1 100 |
| <b>2</b>          | 169 600   | 389 300 | 56 500  | 42 700 | 116 800 | 7 200 |
| <b>2 et QS-21</b> | 322 800   | 371 300 | 378 900 | 56 800 | 263 500 | 5 000 |

**Tableau 7.** Résultats après titration des antisérums par ELISA contre MUC1 (titres définis par la plus grande dilution pour avoir une absorbance de 0,1).

D'après ces résultats, ce vaccin permet d'obtenir une forte réponse immune (surtout de type IgG). De plus une forte réponse en IgG3 est caractéristique d'une réponse anti-carbohydre. Les antisérums ont aussi été testés par FACS sur des cellules MCF-7 de

cancer du sein qui expriment MUC1. Les antisérums réagissent fortement avec ces cellules contrairement aux cellules SK-MEL-28 qui n'expriment pas MUC1.

Dans ce vaccin, l'épitope B de MUC1 est le motif PDTRP glycosylé. Or dans ce cas, la glycosylation de ce motif ne gêne pas la réponse immune contrairement à ce qui a été observé dans les travaux de Westerlind et coll.. Dans ces 2 cas les épitopes sur lesquels sont liés MUC1 sont différents. Ils ont donc une grande responsabilité dans l'induction de la production ou non d'anticorps à moins que ce ne soit une question de densité. En effet dans cette étude, le vaccin est mono-glycosylé ce qui était également plus efficace chez Westerlind et coll., même si le sucre était sur une autre partie de MUC1.

Il faut néanmoins signaler que les résultats obtenus avec MUC sont à différencier selon si le peptide est couplé à une protéine immuno-stimulante comme la KLH ou non.

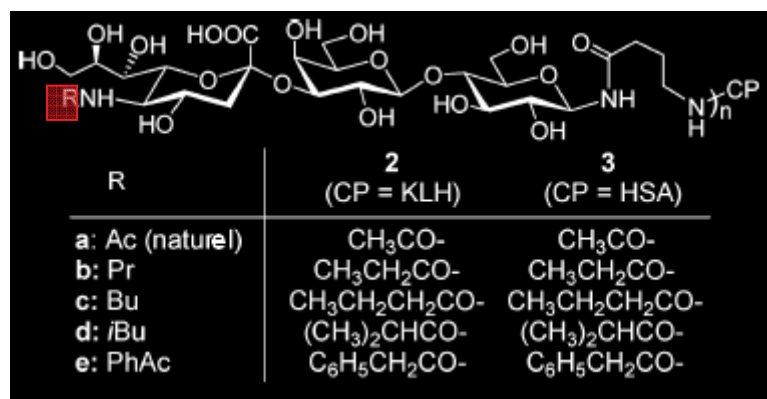
### III.3.3 Vaccin de glycoconjugués synthétiques

Une autre possibilité de contourner le phénomène de tolérance vis-à-vis des antigènes tumoraux consiste à préparer un vaccin composé d'analogues saccharidiques de ces antigènes. Ainsi différentes études se sont portées sur l'étude du pouvoir immunologique de ces antigènes légèrement modifiés.

Tous les antigènes saccharidiques tumoraux sont des cibles pour cette stratégie. C'est notamment le cas de l'acide polysialique (APS). Après propionylation de tous les groupements *N*-acétyl de l'APS, l'antigène modifié est couplé à la KLH (Krug *et al.*, 2004). Ce vaccin a été injecté à des patients atteints d'un cancer du poumon à petites cellules (SCLC). La plupart des patients ont développé une réponse immune IgM spécifique de l'antigène modifié mais cette réponse n'est pas durable dans le temps. Ces anticorps réagissent contre les cellules cancéreuses sans pour autant induire une lyse des cellules.

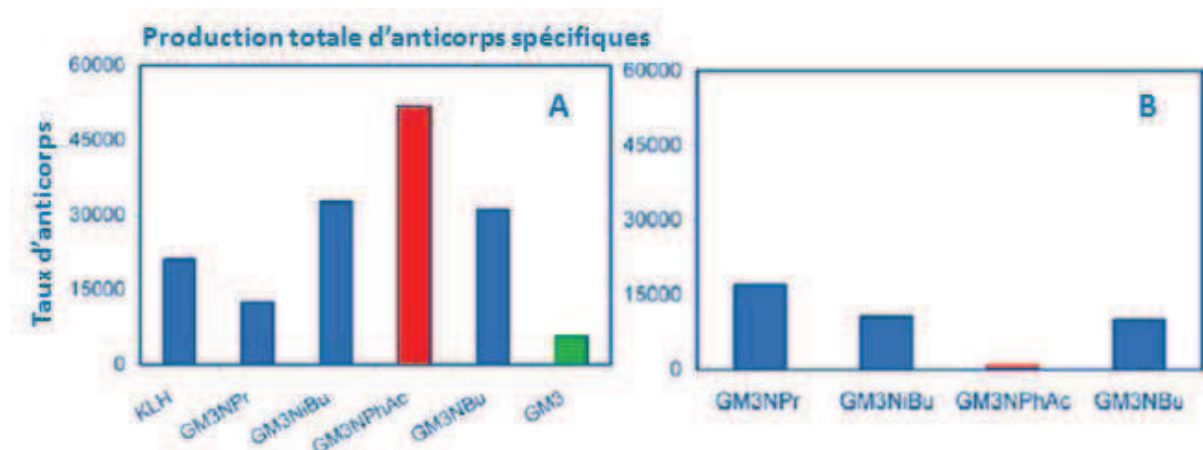
Autre exemple, l'équipe de Guo a étudié des analogues de l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac). Ce sucre est surexprimé dans le cas de cancers ce qui en fait une cible pour la vaccination anti-tumorale. Après avoir synthétisé 4 analogues modifiés au niveau du groupement *N*-acétyl (propionyl, iso-butanoyl, phénylacétyl, trifluoropropionyl), ceux-ci ont été couplés directement sur la KLH avec des taux de conjugaison comparables (Chefalo *et al.*, 2004). Il semble qu'en modifiant l'aspect structural ainsi qu'en augmentant l'hydrophobicité de la molécule avec des groupements plus volumineux, le composé pourrait être plus immunogène. Après immunisation des souris, les antisérums ont été analysés par ELISA. Tous les analogues donnent une meilleure réponse immune que le Neu5Ac (IgG et IgM) à l'exception du trifluoropropionyl. L'acide iso-butanoylneuraminique est le composé qui induit la plus forte réponse en IgG.

Les analogues de sucres sont donc de bonnes cibles pour l'immunothérapie. Dans cette étude, il s'agissait d'un sucre modifié couplé à une protéine porteuse mais il est également possible de modifier un sucre d'un antigène tumoral. Ainsi les analogues préparés précédemment ont été utilisés pour synthétiser différents GM3 modifiés au niveau du groupement *N*-acétyl (figure 18) (Pan *et al.*, 2005).



**Figure 18.** Structures des GM3 *N*-modifiés conjugués sur KLH (pour injections) ou sur HSA (pour les tests ELISA).

Les analogues sont injectés à des souris puis les antisérums sont analysés par ELISA (figure 19).

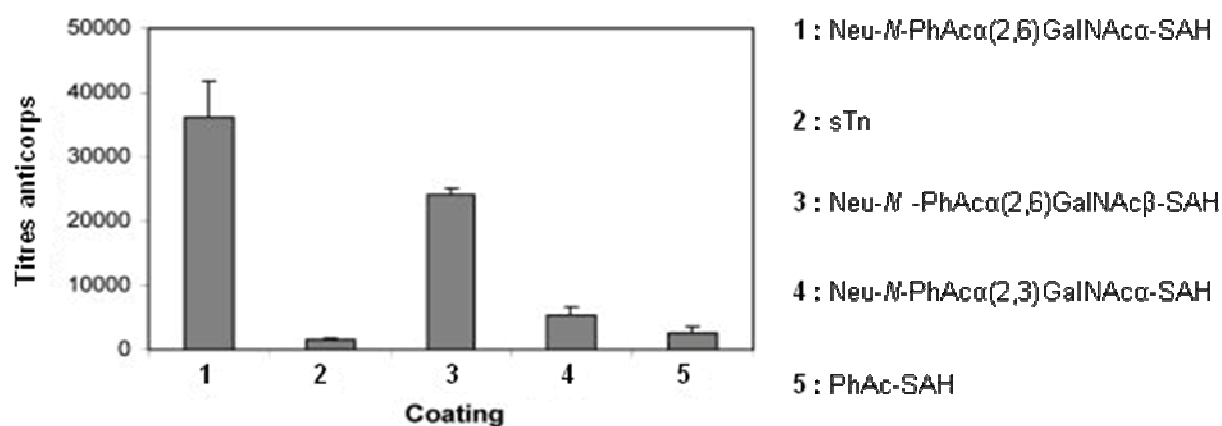


**Figure 19.** Analyse des titres d'anticorps présents dans les anti-sérums après immunisation par ELISA contre les GM3 modifiés respectifs (A) et contre le GM3 naturel (B).

Tous les analogues sont plus immunogènes que le GM3 naturel. Néanmoins le GM3NPhAc semble le plus prometteur d'autant plus que les anticorps produits avec cet analogue sont spécifiques de la partie modifiée du GM3.

L'acide N-acétyl neuraminique a également été modifié avec succès au niveau de l'antigène sialylTn (NeuAc $\alpha$ (2,6)GalNAc). Le sucre a été modifié sur la position N-acétyl par différents groupements : N-propionyl, N-isobutiryl et N-phénylacétyl et l'antigène sTn modifié a été conjugué sur KLH (Wu et Guo, 2006). Après dosage par ELISA des sérums des souris injectées, il s'avère que le meilleur taux d'anticorps est obtenu dans le cas du phénylacétyl. De plus les anticorps obtenus semblent spécifiques du groupement modifié car ces anticorps ne reconnaissent pas le sTn naturel.

Le sTn modifié par le N-phénylacétyl a été conjugué en  $\alpha$  et en  $\beta$  sur KLH afin de vérifier l'influence de la conformation de l'antigène sur la production des anticorps (Wang *et al.*, 2008). Les 2 vaccins donnent une réponse immune plus forte que l'antigène d'origine (sTn). La réactivité des sérums obtenus avec le composé lié à la protéine porteuse en  $\alpha$  a également été étudiée vis-à-vis de différents groupements dérivés du vaccin mais avec des conformations différentes (figure 20).



**Figure 20.** Résultats du dosage par ELISA des antisérums des souris injectées par Neu-N-PhAc $\alpha$ (2,6)GalNAc $\alpha$ -KLH. Différents produits de coating ont été utilisés pour analyser la spécificité des anticorps.

Les antisérums de ce vaccin présentent des titres d'anticorps plus élevés lorsque le dépôt sur la plaque ELISA est l'antigène modifié lié en  $\alpha$ . Pour les autres molécules testées, les titres sont plus faibles. Les anticorps produits reconnaissent l'ensemble de l'antigène sTn-N-phénylacétyl. En effet il n'y a pas de réponse contre le groupe phénylacétyl seul. De plus les anticorps sont spécifiques de la conformation de la molécule car les titres obtenus contre des molécules avec une conformation différente sont moins importants.

Ainsi de bons résultats au niveau de la réponse immunologique ont été obtenus avec des analogues saccharidiques notamment en substituant par différents groupements le N-

acétyl. Les anticorps produits sont spécifiques du sucre modifié mais ils reconnaissent l'antigène en entier.

La réponse immunitaire peut être augmentée à l'aide de vaccins composés de sucres modifiés (production d'anticorps spécifique) qu'ils fassent partie d'un antigène glucidique ou qu'ils soient portés par un peptide. Cependant il est souvent nécessaire de tester différents analogues afin de déterminer le candidat le plus prometteur.

Après avoir testé l'activation du système immunitaire, il faut ensuite vérifier l'expression de l'antigène modifié à la surface des cellules, quelle que soit la stratégie de vaccination choisie (active ou passive).

### III.4 Incorporation dans les cellules de sucres modifiés

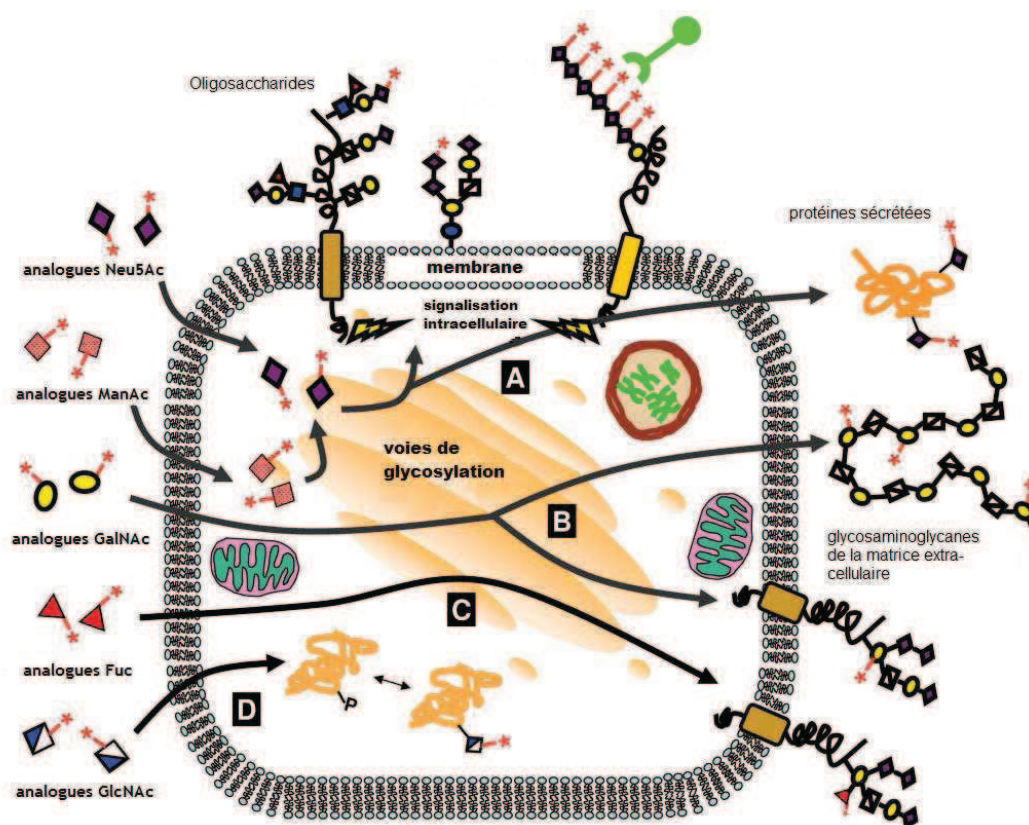


Figure 21. Métabolisme d'analogues saccharidiques dans une cellule (Campbell *et al.*, 2007).

#### III.4.1 Cas de la N-acétylmannosamine et de l'acide N-acétylneuraminique

L'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) est un acide sialique courant chez les mammifères. La *N*-acétylmannosamine (Man5Ac) est un précurseur métabolique

notamment du Neu5Ac. Des analogues de la Man5Ac peuvent être incorporés dans des cellules (figure 21A). Ces analogues pénètrent à travers la membrane et sont intégrés dans la voie de biosynthèse des acides sialiques pour être exprimés sur les glycoprotéines en surface. Il a été démontré que les sucres peracétylés avaient une plus grande lipophilie et ainsi ils traversent plus rapidement la membrane cellulaire (Sampathkumar, Li, et Yarema, 2006). L'incorporation des analogues est bonne pour une faible concentration en sucre mais au-delà d'une certaine quantité, la toxicité des analogues vis-à-vis des cellules augmente avec l'augmentation du nombre de carbones que ce soit sur un groupe hydroxyle ou sur un groupe *N*-acétyl (Kim *et al.*, 2004). Ces analogues peuvent même induire l'apoptose chez des cellules Jurkat ainsi que sur d'autres cellules quand ils sont incorporés dans GM3 et GD3. En effet les cellules traitées par un analogue de la Man5Ac, le convertissent en Neu5Ac grâce à une acide sialique aldolase. L'analogue de Neu5Ac peut alors être métabolisé dans GM3 et exprimé à la surface des cellules. Par exemple l'acide *N*-phénylacétylneuraminique est incorporé au niveau du GM3 de plusieurs lignées cellulaires tumorales. Cependant il existe des différences d'incorporation suivant les analogues. Ainsi le *N*-propionyl, le *N*-butyryl et le *N*-isobutyryl ne sont pas métabolisés par les cellules (Chefalo *et al.*, 2006). L'incorporation des sucres modifiés est mise en évidence par les anticorps spécifiques des sucres produits après injections de GM3 modifiés. Ces résultats permettent d'établir une stratégie de vaccination en activant le système immunitaire par injection de *N*-phenylacétyl GM3 puis en traitant les animaux avec le précurseur *N*-phénylacétylmannosamine (stratégie de vaccination active) (Wang *et al.*, 2007).

### III.4.2 Cas d'analogues du fucose

Le fucose compose l'antigène sialyl lewis<sup>x</sup> présent à la surface de nombreuses cellules cancéreuses. Le fucose pénètre les cellules (figure 21C) puis il est exprimé au niveau des glycoprotéines à la surface des cellules grâce à la voie de secours du fucose. Cette voie comporte d'abord une kinase qui phosphoryle le fucose en position 1 puis la GDP-fucose pyrophosphorylase active le sucre en GDP-fucose et enfin une fucosyltransférase transfère le fucose sur des glycanes ou des glycoprotéines à travers la voie de sécrétion. Différents analogues du fucose ont été synthétisés en remplaçant un groupe hydroxyle en position 2, 4 ou 6 par un groupe azido. Seul le 6-azido est incorporé par les cellules Jurkat (Rabuka *et al.*, 2006). Cet analogue a été employé avec succès pour le marquage de cellules (Sawa *et al.*, 2006) en utilisant la partie azido comme groupement auquel une phosphine taguée est liée par ligation de Staudinger (voir partie IV.2.).

### III.4.3 Cas d'analogues de la N-acétylglucosamine

Les O-glycanes présentant la N-acétylglucosamine (GlcNAc) sont impliqués dans la signalisation cellulaire (figure 21D). Un analogue de la GlcNAc, la N-azido-acétylglucosamine a été incorporé dans des cellules afin d'identifier les différentes protéines possédant de la GlcNAc (Sprung *et al.*, 2005). En effet de nombreuses protéines comme des facteurs de transcription ou des protéines de pore nucléaire sont modifiées par des O-GlcNAc. Cette modification est répandue sur des protéines cruciales ce qui laisse penser que le GlcNAc joue un rôle important en biologie.

### III.4.4 Cas de l'acide N-glycolylneuraminique

Le Neu5Gc est formé par l'hydroxylation du CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc par l'enzyme CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH). Le Neu5Gc est un acide sialique abondant chez la plupart des mammifères même chez les grands singes mais il est absent chez l'homme du fait d'une mutation de la CMAH. La plupart des humains développent de faibles taux d'anticorps anti-Neu5Gc et produisent une réponse immune lorsque du Neu5Gc leur est administré (antiserum d'origine animale comme un anti-venin ou un anti-tétanos). Toutefois le Neu5Gc est retrouvé dans des glycoconjugués de cellules de certains cancers (tableau 8).

| Tissus             | Neu5Gc (% total d'acides sialiques) |            |            |
|--------------------|-------------------------------------|------------|------------|
|                    | Glycosphingolipides                 | N-glycanes | O-glycanes |
| Ovaire (sain)      | < 0,25                              | < 0,25     | < 0,25     |
| Cancer des ovaires | 2,34                                | 1,25       | 1,05       |
| Cancer du pancréas | 1,33                                | 3,33       | < 0,25     |
| Cancer du sein     | 2,43                                | 1,03       | < 0,25     |

**Tableau 8.** Mise en évidence de la présence de Neu5Gc dans différents tissus cancéreux (Hedlund *et al.*, 2008). Valeurs obtenues à l'aide d'un anticorps polyclonal de poulet anti-Neu5Gc.

Chez l'homme, les sources de Neu5Gc sont alimentaires mais la majorité du Neu5Gc n'est pas absorbée et est éliminée. Le Neu5Gc peut cependant être incorporé dans les glycoprotéines des cellules humaines par apport exogène (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). L'incorporation de Neu5Gc a été étudiée sur différentes cellules malignes. Alors que des cellules humaines normales n'incorporent pas le Neu5Gc, ce n'est pas le cas des cellules T

activées (Nguyen *et al.*, 2005). Le Neu5Gc se retrouve également sur les glycoprotéines de lignées de cellules leucémiques humaines. Ces résultats permettent de penser que des cellules cancéreuses pourraient être ciblées grâce au Neu5Gc.

Cependant, dans deux études récentes, il a été démontré que la présence de Neu5Gc dans les tumeurs combinée à celle d'anticorps anti-Neu5Gc favorise la croissance de la tumeur en induisant une faible inflammation (due à l'infiltration de cellules immunitaires provoquant l'inflammation) et l'augmentation de l'angiogénèse (Hedlund *et al.*, 2008). Ce phénomène proviendrait de la combinaison d'anti-Neu5Gc présent dans tous les sérums humains et de Neu5Gc incorporé dans les cellules cancéreuses humaines qui permettrait l'activation du système endothélial. En effet l'incubation de sérums humains présentant des anti-Neu5Gc avec des cellules endothéliales cultivées avec du Neu5Gc de façon à présenter cet acide sialique à leur surface induit l'activation du système endothélial, comme par exemple l'expression des E-sélectines et l'adhérence des monocytes (Pham *et al.*, 2009).

Ainsi le Neu5Gc a tout d'abord été considéré comme cible dans l'immunothérapie du cancer du fait que les cellules cancéreuses absorbent plus rapidement le Neu5Gc apporté de façon exogène par l'alimentation et le présentent au niveau des glycoprotéines à leur surface. Mais il s'est avéré que le Neu5Gc en interagissant avec les anti-Neu5Gc provoque une inflammation qui est favorable à la croissance des tumeurs.

### III.4.5 Cas de la N-acétylgalactosamine

Cette partie sera discutée dans le paragraphe suivant.

## IV. Sucre d'intérêt : la GalNAc

### IV.1 La GalNAc, une cible pour la vaccination anti-tumorale

#### IV.1.1 La N-acétylgalactosamine, un antigène tumoral

La GalNAc est un sucre présent sur de nombreux glycoconjugués. Liée au niveau d'une sérine ou thréonine, elle forme l'antigène tumoral le plus courant, l'antigène Tn, un biomarqueur du cancer chez l'homme (Li *et al.*, 2009). Il est généralement masqué par d'autres sucres dans le cas de tissus sains mais il est présent dans 90 % des adénocarcinomes humains (Springer, 1997). Il joue un rôle dans l'adhérence des cellules, la croissance des tumeurs et leur migration. Il a ainsi été étudié comme biomarqueur de diagnostic et de pronostic dans le cas de cancer du sein (Kumar *et al.*, 2005b).

La GalNAc est le premier sucre fixé lors de la O-glycosylation de type mucine. Elle est donc le sucre initial lors de la synthèse d'autres antigènes tumoraux tels que l'antigène T ou le sialyl Tn. De plus les mucines exprimées à la surface de cellules cancéreuses sont sous glycosylées par rapport aux mucines d'une cellule saine et les glycanes sont plus courts. La GalNAc est alors plus accessible. Cependant, avec l'antigène Tn, il existe également un phénomène de tolérance et ainsi il n'y a pas de réponse immune.

La GalNAc est aussi un sucre qui compose les N-glycanes. C'est par exemple le cas de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) qui, dans le cas de cellules saines présente une minorité de GalNAc sur ses N-glycanes biantennés. Des analyses par spectrométrie de masse des PSA de cellules cancéreuses ont permis de mettre en évidence l'augmentation de 25 à 65 % du taux de GalNAc (Peracaula *et al.*, 2003).

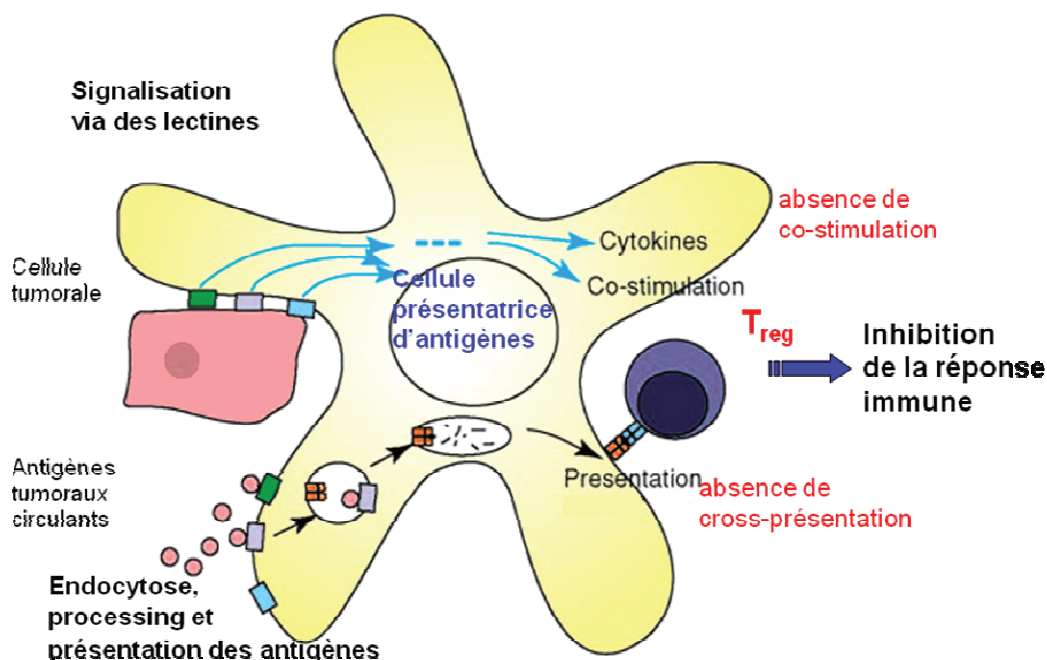
La GalNAc entre également dans la composition de glycolipides comme GD2 et GM2, présents dans les membranes plasmiques, et constituant de surcroît des antigènes tumoraux surexprimés lors de certains cancers (tableau 1).

La GalNAc est aussi un composé de base des glycosaminoglycanes tels que la chondroïtine sulfate et la dermatane sulfate, polysaccharides présents en grande quantité dans les tissus conjonctifs. C'est aussi le sucre immunodominant de l'antigène de groupe sanguin A.

IV.1.2 Macrophage galactose lectine de type 2 (MGL2)

MGL est une lectine de type C, c'est-à-dire qu'elle a besoin de calcium pour remplir son rôle. C'est une protéine du système immunitaire exprimée par les cellules dendritiques immatures et par les macrophages. MGL reconnaît spécifiquement les GalNAc terminaux comme ceux exprimés à la surface de parasites mais également les GalNAc des antigènes tumoraux présents sur MUC1 (Saeland *et al.*, 2007), GM2 et GD2 (van Vliet *et al.*, 2005). Il existe deux formes de MGL chez la souris MGL1 et MGL2. MGL2 de souris est encore plus spécifique des GalNAc terminaux car elle ne reconnaît pas l'antigène Lewis<sup>x</sup> contrairement à MGL1 (Singh *et al.*, 2009). MGL2 est la forme se rapprochant le plus de la MGL unique présente chez l'homme.

Les cellules dendritiques ont un rôle crucial dans la réponse immune. Elles présentent à leur surface des lectines telle que MGL2 qui participent à la reconnaissance des cellules présentatrices d'antigènes ce qui permet l'activation des cellules T. Cependant les cellules tumorales contournent cette réponse immune. L'interaction des cellules dendritiques (CD) avec les antigènes tumoraux modifierait la fonction des CD (production de cytokines immunosuppressives) ou inhiberait la migration des CD vers la tumeur ainsi que leur activation (van Kooyk, 2008) et favoriserait le recrutement des cellules T régulatrices (figure 22).



**Figure 22.** Représentation schématique de la reconnaissance d'une tumeur par une cellule dendritique via des lectines (schéma d'après Aarnoudse *et al.*, 2006).

La réponse immune via MGL2 n'est cependant pas encore clairement élucidée. Dans des études récentes, il a été montré que la reconnaissance par MGL2 d'un antigène présentant de la GalNAc entraîne la présentation de celui-ci par les CD ainsi qu'une prolifération des cellules T CD4 (Denda-Nagai *et al.*, 2010) et l'augmentation du nombre des cellules T CD4 produisant de l'interféron  $\gamma$  (Singh *et al.*, 2010). Cette prolifération n'a néanmoins été observée que sur les CD de la moelle osseuse et pas sur les CD spléniques. La liaison de MGL2 sur un antigène présentant de la GalNAc induit également la prolifération des cellules T CD8 dans le cas des CD spléniques et de la moelle osseuse. Dans cette étude il est remarqué qu'une faible densité en GalNAc pourrait être à l'origine de la reconnaissance spécifique par MGL2 qui induit ensuite la présentation croisée, phénomène indispensable à une réponse immune efficace contre les cellules cancéreuses.

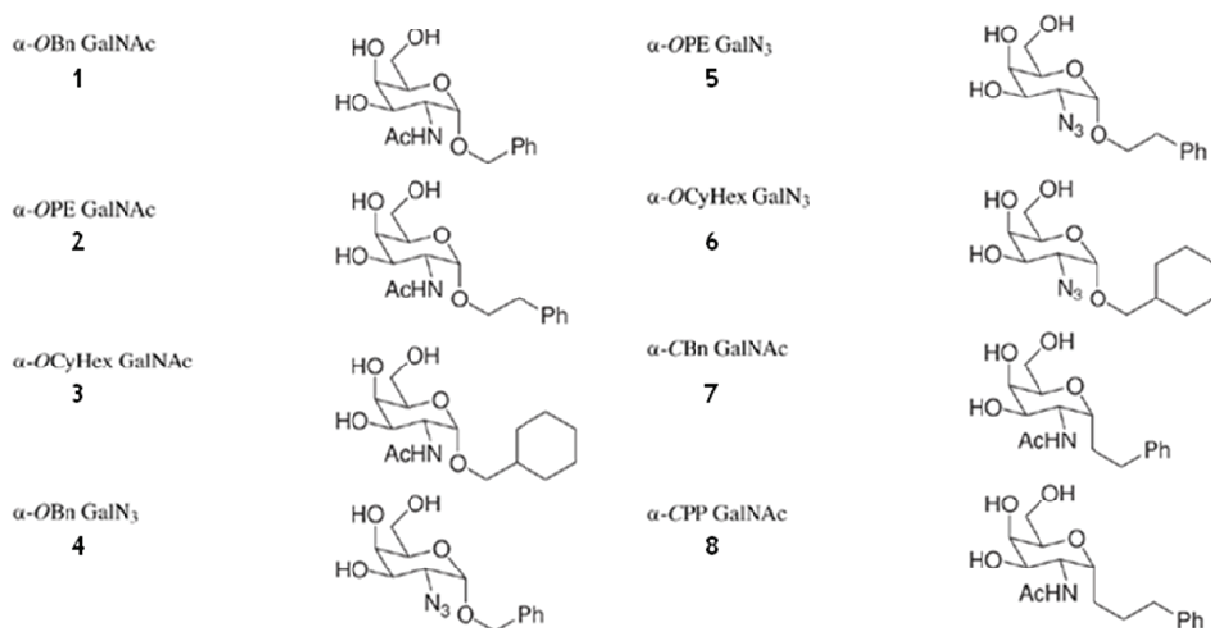
L'utilisation de MGL2 dans des stratégies de lutte contre le cancer nécessite donc encore plusieurs études notamment *in vivo* puisqu'il semble que dans certains cas la liaison de MGL2 avec de la GalNAc induise une réponse immunosuppressive et dans d'autres la prolifération de cellules T CD4 et CD8. Ces observations dépendent également de la provenance des CD. Il peut cependant être intéressant de regarder comment se comporte MGL2 avec des analogues de la GalNAc et d'étudier la réponse obtenue.

### IV.2 Utilisations d'analogues de la GalNAc

Des analogues variés de la GalNAc ont déjà été synthétisés en substituant diverses positions la GalNAc.

Un des tout premiers analogues étudié est la GalNAc $\alpha$ -O-Bn dont l'effet sur la biosynthèse des mucines a été évalué (Huet *et al.*, 2003). Le traitement de cellules par ce composé a conduit à l'augmentation de l'expression de l'antigène Tn (GalNAc-Thr/Ser) mais aussi de l'antigène T (Gal $\beta$ 1-3GalNAc) sur les mucines sécrétées par ces cellules. En effet le motif Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-Bn est synthétisé dans les cellules traitées par la GalNAc $\alpha$ -O-Bn et inhibe l'élongation de la structure de l'antigène T car étant un substrat d'un grand nombre de glycosyltransférases, il entre en compétition avec les substrats naturels de ces enzymes. La GalNAc $\alpha$ -O-Bn provoque également la diminution de l'expression d'antigènes sialyl Lewis<sup>x</sup> et sialyl T dans les cellules spécifiques de ces structures en inhibant, toujours par compétition, l'incorporation de l'acide sialique Neu5Ac sur les O-glycanes des mucines.

D'autres analogues de la GalNAc $\alpha$ -O-Bn ont été récemment préparés (Patsos *et al.*, 2009) (figure 23).

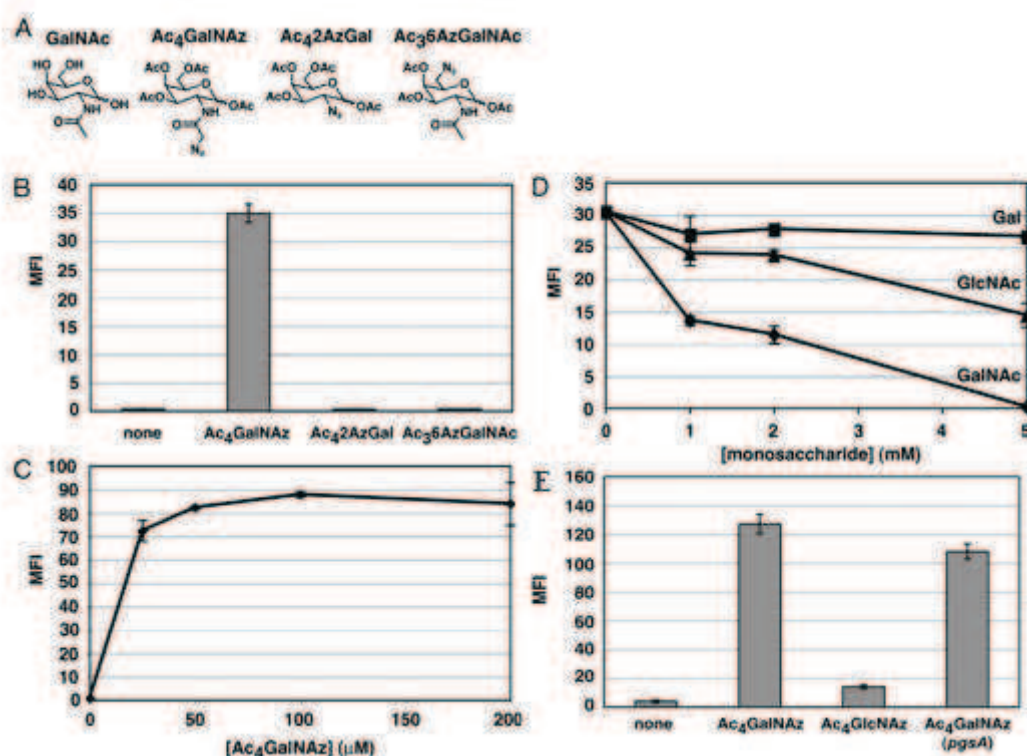


**Figure 23.** Schéma des différents analogues de la GalNAc-O-Bn.

Ces analogues ont été testés sur des cellules colorectales cancéreuses et ont provoqué une inhibition de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose. Les composés 1, 4 et 7 (représentatifs des analogues par le sucre de départ) ont été incubés avec des cellules humaines du cancer colorectal pour déterminer leur pouvoir d'inhibition sur des glycosyltransférases. Ainsi, pour 0,5 mM de sucre, la synthèse du core 1 et l'activité de la sialyltransférase ST6GalNAc I sont inhibés mais avec des différences selon la lignée. L'analyse des glycanes par des lectines permet d'observer la présence de O-glycanes tronqués et une augmentation de galactose en  $\beta$ . Par spectrométrie de masse, il a été montré que les analogues étaient incorporés dans les glycanes identiques à ceux présents à la surface des cellules. Les composés 1, 4 et 7 modifient également l'expression de gènes (sur- ou sous- expression), essentiellement des gènes de transcription, prolifération et transduction du signal. La modification de l'expression de ces gènes semble induire l'apoptose et la diminution de la prolifération des cellules. Ils interviennent donc dans la synthèse de protéines. Cependant l'expression des gènes responsables de la synthèse de glycosyltransférases n'est pas modifiée. Tous ces résultats sur la régulation des gènes sont tout de même différents d'un analogue à un autre. Le composé 1 ayant un effet majeur sur la surexpression des gènes de transcription alors que le composé 2 intervient surtout sur la sous-expression des gènes de prolifération et le 7 sur la surexpression des gènes de transcription, adhérence, transduction du signal. Il est donc intéressant de synthétiser toute une gamme d'analogues afin d'augmenter les chances de trouver des composés ayant une/des activités à divers niveaux sur les cellules cancéreuses.

Des analogues de la GalNAc portant la fonction azido ont également été étudiés. L'avantage de la fonction azido est qu'elle peut facilement être repérée en faisant réagir une phosphine portant un tag FLAG par ligation de Staudinger. Le tag est ensuite reconnu par un anticorps anti-FLAG couplé à l'HRP, enzyme qui catalyse la conversion du substrat ABTS en un complexe coloré absorbant à 450 nm (Saxon et Bertozzi, 2000) ou couplé à un marqueur fluorescent (Laughlin *et al.*, 2006).

Différents analogues ont été synthétisés (figure 24A) et incubés avec des cellules CHO (cellules souvent utilisées dans la production de protéines recombinantes). L'Ac<sub>4</sub>GalNAz est le seul sucre modifié incorporé et le maximum d'incorporation est obtenu pour 50 µM de sucre (figure 24B et C). Cet analogue a ensuite été administré à des cellules en présence d'un compétiteur (Gal, GlcNAc et GalNAc). Le galactose ne supprime pas le signal dû à la fonction azido contrairement au GalNAc (figure 24D). Ces résultats suggèrent que la GalNAz emprunte la voie de secours du GalNAc, celle où la GalNAz est convertie en UDP-GalNAz avant d'être utilisée par une GalNAc transférase. Le GlcNAc inhibe partiellement car celui-ci est converti en UDP-GalNAc par l'enzyme UDP-Gal/GalNAc 4 épimérase. Dans les cellules CHO, la GalNAz peut se trouver sur des O-glycanes ou sur la chondroïtine sulfate ou sur les glycolipides. Des cellules CHO mutantes incapables de produire des protéoglycanes (pgsA) ont été employées. Après incubation en présence de GalNAz, il n'y a pas de différence de réponse entre la lignée normale et celle mutée (figure 24E). La GalNAz incorporée se situe donc principalement au niveau des O-glycanes et des glycolipides.



**Figure 24.** Analogues de la GalNAc utilisée pour diverses expériences (A) d'incubation dans des cellules CHO sauvages (B et C). Le meilleur substrat a été incubé en présence d'un compétiteur (D) et dans une lignée de CHO mutée (*pgsA*) (E). L'incorporation des sucres a été évaluée par mesure de la fluorescence des cellules en cytométrie en flux. (Hang *et al.*, 2003).

Le Ac<sub>4</sub>GalNAz a aussi été injecté à des souris (Dube *et al.*, 2006). Les glycoprotéines présentant de la GalNAz ont été retrouvées au niveau du foie, des reins et du cœur alors qu'il n'a pas été possible de les observer au niveau du thymus et du cerveau. Cette différence s'explique probablement par la bonne vascularisation du foie, des reins et du cœur ainsi que par leur importante production de glycoprotéines de type mucine. La GalNAz peut donc être utilisée comme un outil de diagnostic car elle permet de mettre en évidence les changements de O-glycosylation dans les tissus. Elle peut également être un outil de ciblage car il est possible par ligation de Staundinger sur la GalNAz d'un agent thérapeutique de diriger celui-ci. En effet la phosphine qui se lie au groupement azido peut être couplée à une molécule qui sera la cible d'un médicament par exemple.

En remarque, dans le cas de dérivé azido du fucose, seul le 6-azido pénètre dans les cellules. Ainsi des sucres différents mais ayant des groupements modifiés identiques n'ont pas les mêmes propriétés. Pour chaque sucre, il est donc nécessaire de préparer plusieurs analogues et un analogue qui aura des propriétés intéressantes pour un type de sucre ne donnera pas forcément le même résultat avec un autre sucre.

Un autre analogue synthétisé de longue date, le 4-FluoroGalNAc (Berkin *et al.*, 2000), avait été testé sur la croissance d'hépatocytes et avait montré un effet inhibiteur sur la biosynthèse des GAG. Ce composé a depuis été utilisé dans des cellules de la lignée promyélocytaire (HL-60) comme inhibiteur afin de réduire la *O*-glycosylation, donc la formation de l'antigène sLe<sup>x</sup> et de ce fait la reconnaissance des leucocytes par les sélectines (Marathe *et al.*, 2010). Il semble que le 4-FluoroGalNAc soit incorporé dans les glycanes de PSGL-1, ligand des sélectines et protéine de type mucine. Après traitement par cet analogue, le poids total des glycanes de PSGL-1 est réduit de 20 à 25 % ce qui montre une altération de la *O*-glycosylation et qui conduit à une moins bonne reconnaissance de PSGL-1 par les sélectines.

Il est donc possible d'incorporer des analogues de la GalNAc dans la machinerie cellulaire et d'observer à la surface des cellules des glycoprotéines présentant ces sucres modifiés. Néanmoins peu d'études ont été menées concernant l'utilisation de ces analogues en tant que vaccin anti-tumoral soit en injectant directement un sucre modifié soit en glycosylant des peptides par ces composés.

### IV.3 *O*-glycosylation d'un peptide

#### IV.3.1 Synthèse du précurseur UDP-sucres

L'UDP-GalNAc est le substrat de nombreuses ppGalNAc transférases. Il est donc indispensable de passer par ce composé pour glycosyler un peptide ou une protéine. L'UDP-GalNAc peut être préparé de façon chimique mais cette méthode est longue et mène à de faibles rendements. Pour réaliser la synthèse de l'UDP-sucres, il faut d'abord obtenir le sucre sous une forme activée, souvent à l'aide d'un groupement phosphate (Busca et Martin, 2004), (Lazarević et Thiem, 2002), (Lazarević et Thiem, 2006). Lazarević et Thiem ont d'abord phosphorylé la galactosamine puis ils ont préparé différents analogues de la GalNAc (substitués sur le groupement *N*-acétyle) et enfin ils ont formé les UDP sucres. Les rendements obtenus sont moyens (tableau 9).

| Analogues                  | Rendement après phosphorylation | Rendement de synthèse des analogues | Rendement de formation de l'UDP-sucré | Rendement final |
|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| <i>N</i> -propionyl-GalN   | 71 %                            | 90 %                                | 31 %                                  | 20 %            |
| <i>N</i> -butyryl-GalN     | 71 %                            | 84 %                                | 32 %                                  | 19 %            |
| <i>N</i> -bromoacétyl-GalN | 71 %                            | 82 %                                | 30 %                                  | 17 %            |

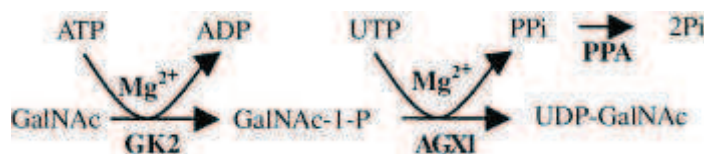
**Tableau 9.** Rendement de synthèse d'analogues UDP-GalNAc par voie chimique (Lazarević *et al.*, 2002).

L'avantage de cette méthode est que le protocole de synthèse chimique peut être appliqué sur de nombreux sucres.

La synthèse enzymatique est une bonne alternative. Une des voies enzymatiques consiste à convertir l'UDP-GlcNAc en UDP-GalNAc à l'aide de l'UDPGlcNAc-4 épimérase (Piller *et al.*, 1982). Cependant cette méthode possède un faible rendement du à la difficulté de séparer l'UDP-GlcNAc de l'UDP-GalNAc. Une autre voie enzymatique a été étudiée récemment par l'équipe de Wang dans laquelle la GalNAc est activée par une GalNAc-kinase pour former la GalNAc-1P à son tour convertie en UDP-GalNAc par une pyrophosphorylase. La *N*-acétylhexosamine kinase (NahK) utilisée est produite par une bactérie, *Bifidobacterium longum*. La spécificité de cette enzyme a été testée à l'aide de divers analogues de la GalNAc (Cai *et al.*, 2009). De bons rendements de phosphorylation ont été obtenus avec certains analogues. Le groupement amino en position 2 est indispensable mais l'enzyme tolère la substitution de ce groupe amino même par des molécules volumineuses comme le phényle. L'enzyme accepte également comme substrat des analogues modifiés en position 4 soit par substitution par N<sub>3</sub> ou par perte du groupement hydroxyle. L'équipe de Wang s'est ensuite intéressée à une GlcNAc-1P pyrophosphorylase, la GlmU produite par *E. coli* qui forme l'UDP-GlcNAc à partir du GlcNAc-1P. Différents analogues phosphatés ont été utilisés comme substrat de l'enzyme (Guan *et al.*, 2009). L'enzyme tolère les analogues de la *N*-acétylglucosamine sauf quand le groupement est trop volumineux tel qu'un phényle sur le groupement amino. Les sucres modifiés en position 6 ou 2 sont donc substrats. La GalNAc et la 6-désoxyGalNAc sont de bons substrats de la GlmU mais les autres analogues de la GalNAc testés ne sont pas utilisés par l'enzyme. Ce système de synthèse (NahK + GlmU) d'analogues de l'UDP-GalNAc est peu performant vis-à-vis des analogues de la GalNAc. En effet, la NahK est une enzyme plutôt permissive vis-à-vis des analogues de la GalNAc mais ce n'est pas le cas de la GlmU.

#### IV.3.2 Voie de synthèse enzymatique d'UDP-sucre mise au point par notre équipe

La voie enzymatique développée par notre équipe présente 3 enzymes recombinantes (Bourdeaux *et al.*, 2005). La première, une GalNAc kinase (GK2) humaine, phosphoryle le sucre en position 1. La deuxième, l'UDP-GalNAc pyrophosphorylase humaine (AGX1), convertit la GalNAc-1P en UDP-GalNAc. GK2 et AGX1 recombinantes ont été produites chez *E. coli*. La dernière enzyme, la pyrophosphatase (PPA) de levure, dirige la réaction dans le sens de production de l'UDP-GalNAc en évitant la réaction inverse (figure 25).



**Figure 25.** Schéma de la synthèse enzymatique d'UDP-GalNAc.

Cette méthode avait permis d'obtenir de l'UDP-GalNAc et de l'UDP-GalNAz avec de très bons rendements (68 à 90 %).

La GalNAc kinase (GK2) phosphoryle la GalNAc en position 1 pour former la GalNAc- $\alpha$ -1P en utilisant l'ATP comme donneur de phosphate. La GK2 de rein de porc purifiée a été testée avec d'autre sucre comme substrat (tableau 10).

| Sucre  | Activité spécifique<br>(nmol/mg de protéine pour 5 min de réaction) |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| GalNAc | 146,5                                                               |
| GalN   | 1,0                                                                 |
| Gal    | 1,64                                                                |
| GlcNAc | 0,27                                                                |
| GlcN   | 0                                                                   |
| Glc    | 0                                                                   |
| ManNAc | 0                                                                   |

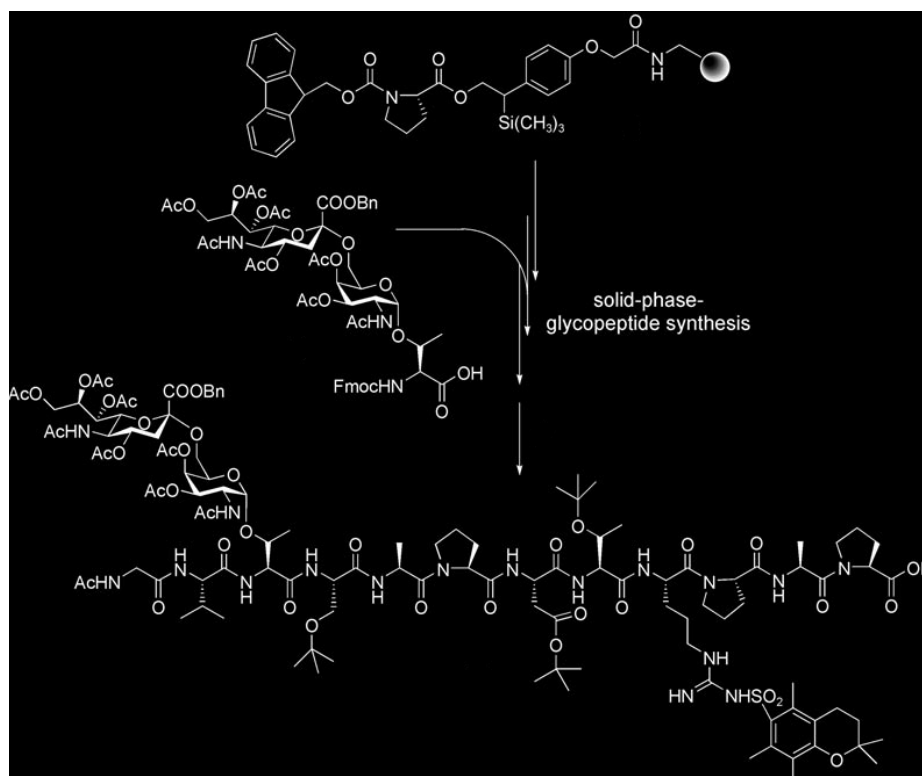
**Tableau 10.** Spécificité de quelques sucres pour GK2 (Pastuszak *et al.*, 1996).

Il apparaît que seul la GalNAc est un substrat pour GK2. La GK2 humaine possède 90 % d'homologie avec le GK2 de rein de porc.

L'UDP-GalNAc pyrophosphorylase utilise l'UTP pour convertir la GalNAc-1P en UDP-GalNAc. L'enzyme montre un  $K_m$  de 1,1 mM pour le GalNAc-1P contre 5,8 pour le Glc-1P (Szumilo *et al.*, 1996). Le groupement N-acétyle semble être indispensable pour l'activité de l'enzyme. Après clonage de cette enzyme (Wang-Gillam *et al.*, 1998), il est apparu qu'elle est en fait un dimère composé de deux sous unités de taille semblable et dont la séquence ne diffère que par l'insertion de 17 acides aminés dans la région C-terminale. Ces 2 protéines, AGX1 (57 kDa) et AGX2 (64 kDa), ont des activités différentes vis-à-vis du GalNAc-1P, AGX1 étant plus spécifique.

### IV.3.3 Synthèse de glycopeptides

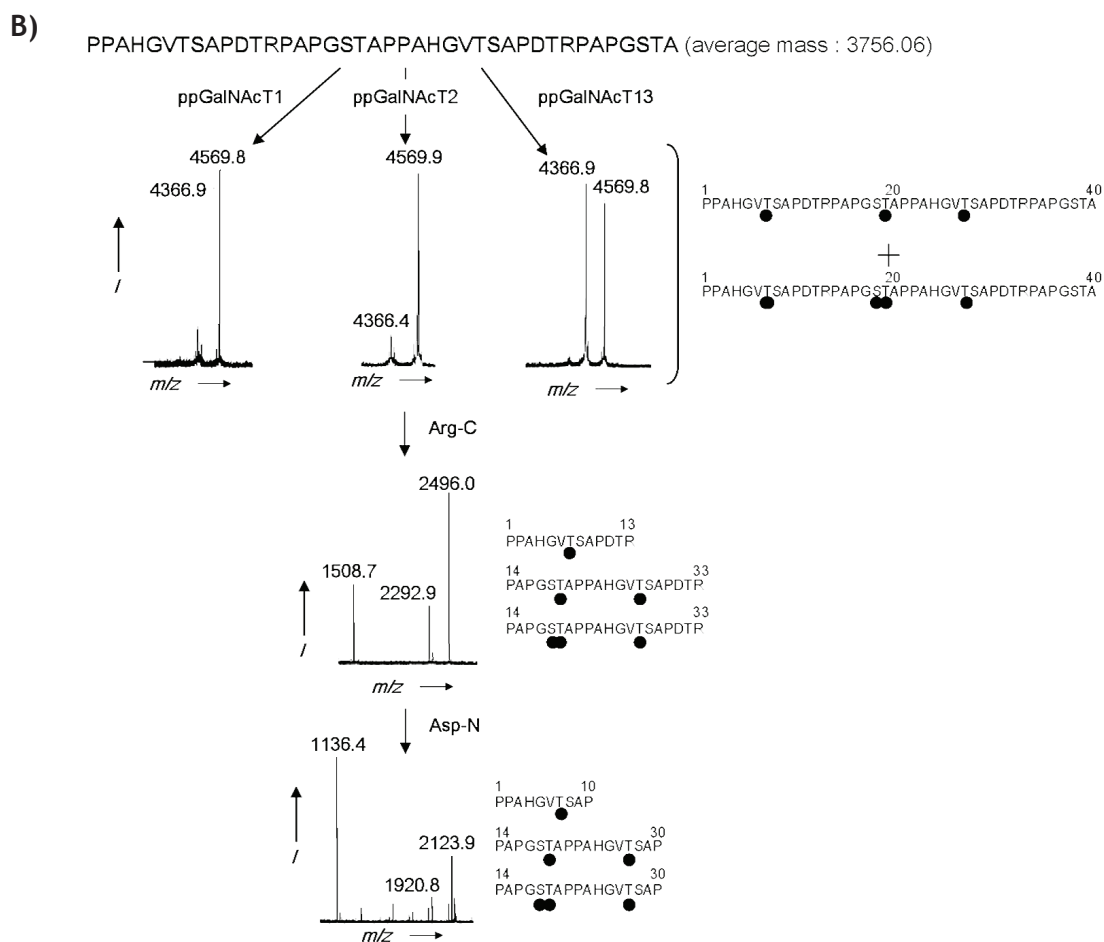
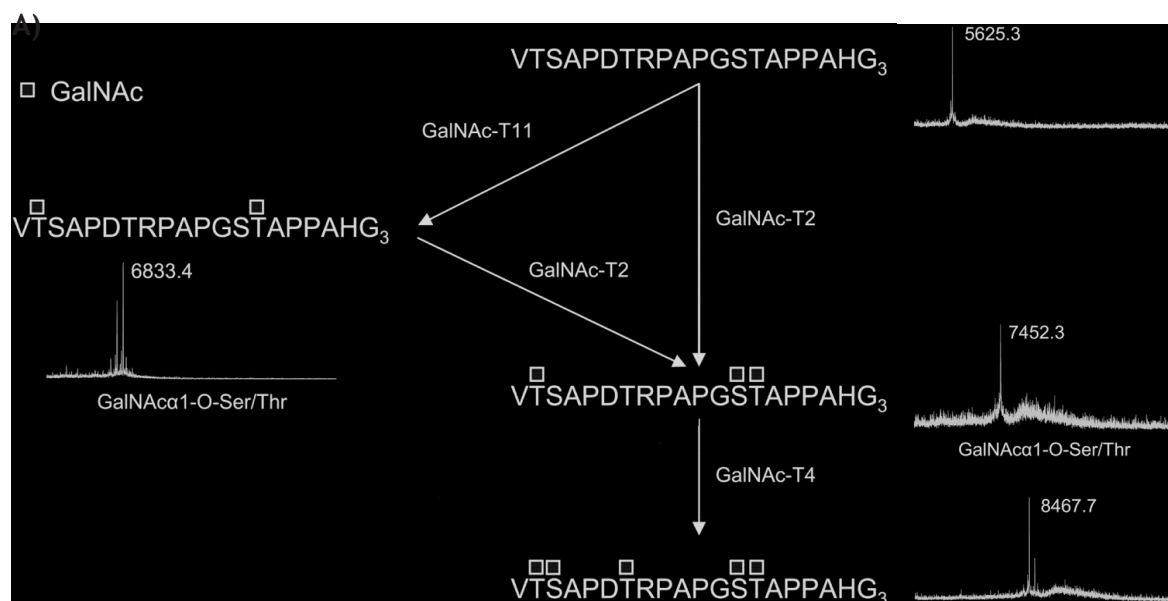
La glycosylation peut se faire par voie chimique à l'aide de « building blocks » composés d'une sérine ou d'une thréonine glycosylée et souvent avec un groupe protecteur. Ainsi l'équipe de Kunz a utilisé la synthèse sur support solide pour réaliser un MUC1 glycosylé (Dziadek *et al.*, 2005) (figure 26).



**Figure 26.** Exemple de synthèse sur support solide d'un glycopeptide

Le problème de la synthèse chimique est qu'elle nécessite de nombreuses étapes et donc elle reste limitée à de petites molécules.

La glycosylation enzymatique est devenue une bonne alternative avec l'augmentation du nombre de glycosyltransférases recombinantes disponibles. Ces enzymes ont des propriétés cinétiques et des spécificités différentes d'une isoforme à une autre. Ainsi H. Clausen, pour glycosyler des segments de MUC1 sur des sites spécifiques, a utilisé 3 ppGalNAc transférases différentes (GalNAc-T2, T4 et T11) (Sørensen *et al.*, 2006) (figure 27). De même GalNAc T1, T2 et T13 ont été utilisées dans l'équipe (Bourdeaux *et al.* 2007) pour glycosyler aussi des peptides de MUC1.



**Figure 27.** Schéma de la glycosylation de MUC1 par plusieurs ppGalNAc transférases **A)** d'après (Sorensen et al. 2006), **B)** d'après (Bourgeaux et al., 2007).

Pour effectuer la synthèse des glycopeptides, un bio-réacteur enzymatique a été mis au point par notre équipe afin de glycosyler des peptides ou protéines en une seule réaction (Bourgeaux *et al.*, 2007). Ce cycle comporte 3 enzymes principales : GK2, AGX1 et une polypeptide  $\alpha$ GalNAc transférase 1 (ppGaNT1) recombinante ainsi que 2 autres enzymes chargées de recycler les produits secondaires des différentes réactions afin que ces derniers n'inhibent pas le transfert de sucre sur le peptide (figure 28). En effet l'UDP est un inhibiteur de la ppGalNAc transférase.

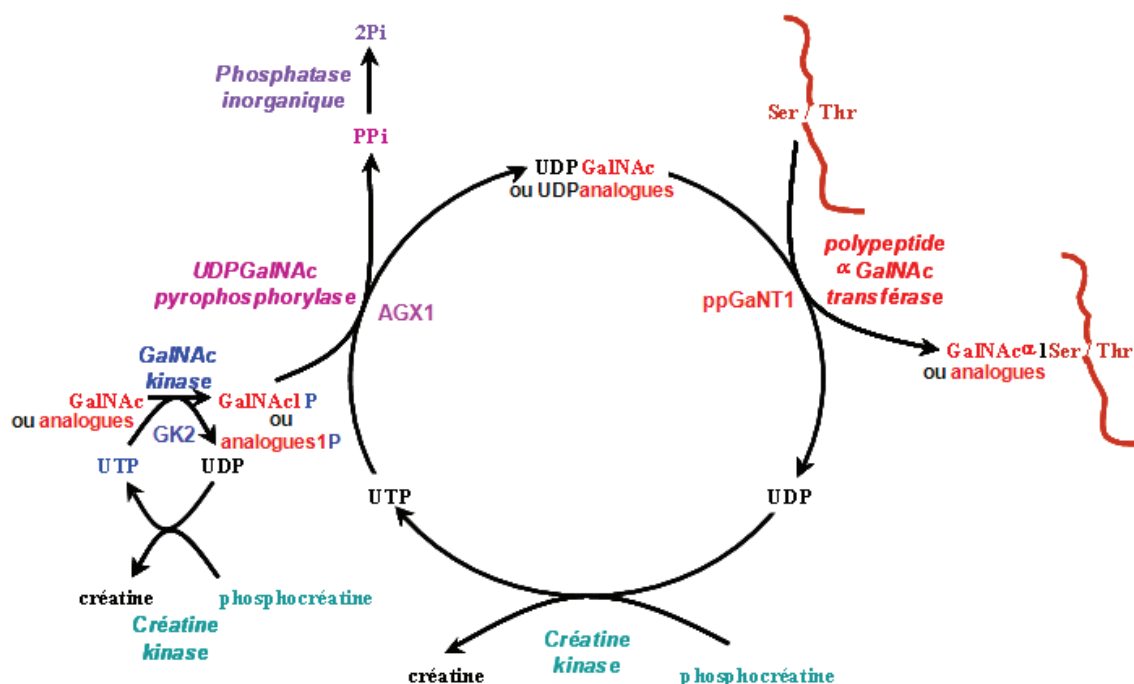
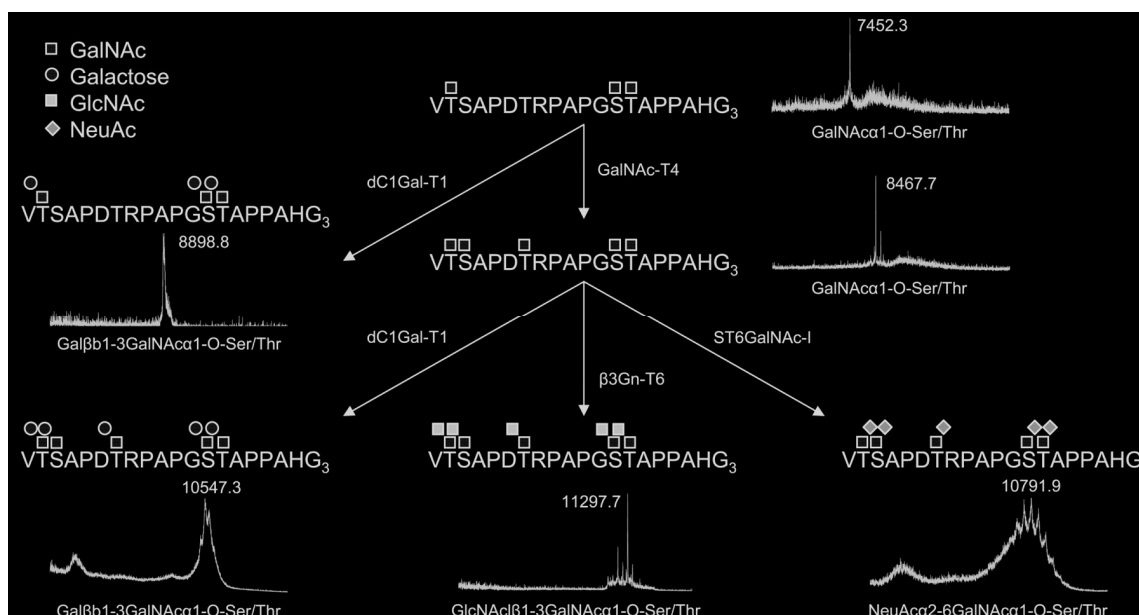


Figure 28. Schéma du cycle enzymatique de glycosylation d'un peptide.

Ce cycle offre un moyen performant de synthèse de glycopeptides. Il peut être employé sur plusieurs mg de peptides. Pour poursuivre la synthèse des glycanes, les glycopeptides obtenus peuvent être glycosylés par d'autres enzymes telles que des sialyltransférases, des GlcNAc transférases et des Gal transférases (figure 29).

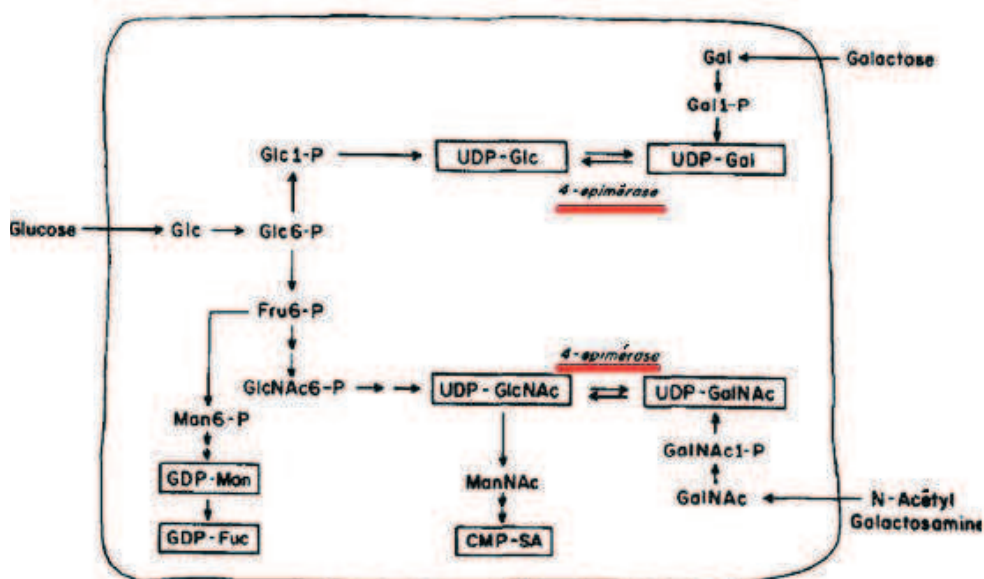


**Figure 29.** Schéma de la glycosylation de MUC1 par diverses enzymes (Sørensen *et al.*, 2006).

La synthèse enzymatique est donc un outil efficace pour la glycosylation de protéine. Notre but est de préparer des biomolécules à partir d'analogues de la GalNAc. Ce travail repose donc sur le fait de trouver des analogues substrats des différentes enzymes utilisées pour la synthèse de glycoprotéines.

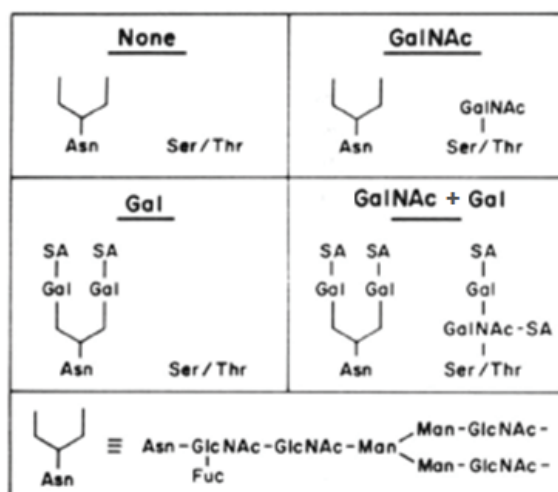
#### IV.3.4 Outils pour vérifier l'incorporation des analogues de la GalNAc

Pour vérifier l'incorporation des analogues au niveau des glycanes présents à la surface de cellules, les cellules de type CHO-IldD sont un outil approprié. Ces cellules sont dépourvues de GalNAc à leur surface. En effet, elles ont la particularité d'être déficientes en enzyme UDP-galactose / UDP-GalNAc 4-épimérase (figure 30). Ainsi ces cellules cultivées en présence de glucose ne synthétisent pas l'UDP-galactose et l'UDP-GalNAc nécessaires à la synthèse normale de glycoprotéines et de glycolipides. La voie de O-glycosylation de type mucine est donc inhibée et la GalNAc n'est pas présente à la surface de ces cellules (Kingsley *et al.*, 1986).



**Figure 30.** Schéma des différentes voies de synthèse des nucléotides sucres donneurs pour l'addition de ces sucres sur des protéines : la voie normale à partir de glucose et la voie de récupération à partir de galactose et de la GalNAc.

Ce défaut de glycosylation peut être corrigé par l'apport exogène de galactose et de GalNAc (figure 31). En cultivant les cellules en présence de ces sucres, ceux-ci pénètrent les cellules, y sont convertis en nucléotide-sucre et ensuite utilisés dans la synthèse de glycoconjugués. Ainsi l'ajout de galactose restaure la synthèse de *N*-glycanes et l'ajout de GalNAc les *O*-glycanes de type mucine. Une fois ces sucres fixés sur la protéine, la synthèse des glycanes se poursuit normalement (Reddy *et al.*, 1989).



**Figure 31.** Structures des N-glycanes et des O-glycanes après l'ajout de galactose ou de GalNAc ou des deux (Reddy et al., 1989).

## Généralités

Ces cellules ont été utilisées au cours de notre travail afin de vérifier l'incorporation des analogues de la GalNAc au niveau des glycoprotéines à leur surface. En effet lorsqu'elles sont cultivées en présence d'un analogue, seul celui-ci sera utilisé pour la synthèse des *O*-glycanes.

Ce travail de thèse s'articule en trois parties principales. Dans un premier temps, j'ai réalisé la synthèse chimique de dérivés de la GalNAc. Après purification et caractérisation de ces sucres, ceux-ci ont été étudiés en tant que substrats des enzymes de la voie de « récupération » de la GalNAc ainsi que de 3 autres enzymes qui interviennent dans la synthèse des *O*-glycanes. Les meilleurs substrats pour ces enzymes ont permis la glycosylation de différents glycoconjugués. Ces derniers ont été injectés à des souris pour étudier leur pouvoir immunologique. Enfin des cellules ont été cultivées en présence des analogues peracétylés de la GalNAc pour vérifier l'incorporation de ces sucres au niveau des glycanes présents à la surface des cellules.

# ***Matériels et méthodes***

# I. Synthèse chimique d'analogues de la N-acétylgalactosamine

## I.1 Matériel

Le chlorhydrate de galactosamine a été acheté chez AppliChem et Sigma, les différents solvants utilisés chez Prolabo, Merck ou Sigma, les plaques d'aluminium pour CCM recouvertes de silice 60 F<sub>254</sub> (épaisseur 0,2 mm) et la silice 40-70 µm (230-400 mesh) utilisée pour la purification chez Merck. Les résines échangeuses d'ions viennent de chez Bio-Rad pour la Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>) AG (analytical grade) 100-200 mesh et de chez Fluka pour la Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>) 200-400 mesh. La Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>) est passée sous forme OH<sup>-</sup> par traitement dans la soude. Pour la filtration sur gel, le Bio-Gel P-2 (<45 µm) vient de Bio-Rad.

## I.2 Synthèse des analogues de la GalNAc

Les protocoles de synthèse sont décrits pour chaque analogue de la N-acétylgalactosamine. Les synthèses ont été réalisées à partir de la galactosamine et sont adaptées de protocoles trouvés dans la littérature (Neuberger.A et Wilson, 1971), (Sampathkumar, Li, Jones, *et al.*, 2006), (Hang *et al.*, 2003), (Keppler *et al.*, 1995) et pour la déacétylation (Sala *et al.*, 1998).

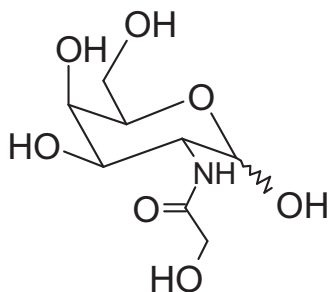
Les techniques de purification par résines échangeuses d'ions et par gel filtration sont décrites dans le paragraphe VI.

Les produits sont obtenus sous la forme d'un mélange d'anomères en équilibre. Les composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse et RMN. Les spectres RMN du proton (<sup>1</sup>H-RMN) ont été enregistrés par Hervé Meudal (CBM, Orléans) sur un appareil Bruker à 500 MHz. Les analogues sont repris dans D<sub>2</sub>O ou dans CDCl<sub>3</sub> quand ils sont peracétylés. L'attribution des signaux a été réalisée quand la résolution des spectres le permettait à partir de données de la littérature (Gottlieb *et al.*, 1997), (Joosten *et al.*, 2003). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport à une référence interne (HOD, 4,79 ppm pour D<sub>2</sub>O et TMS, 0 ppm pour CDCl<sub>3</sub>), les constantes de couplage en Hz. La multiplicité des signaux est désignée par la lettre s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet de doublet) et m (multiplet).

## Matériels et méthodes

Les spectres de masse ont été réalisés par Guillaume Gabant (CBM, Orléans) et par Laetitia Fougère (ICOA, Orléans) par électrospray en mode positif sur un appareil triple quadripole Quatro II (Waters) au CBM et API 300 (Applied Biosystems) à l'ICOA.

Les techniques d'analyses par CCM, RMN et spectrométrie de masse sont décrites dans le paragraphe VII.

**N-glycolylgalactosamine**(GalNHCOCH<sub>2</sub>OH)

Le chlorhydrate de galactosamine (200 mg, 0,928 mmole) est dissout dans le méthanol (8 mL) et 1 eq de NaOMe (50,1 mg, 0,928 mmole) est ajouté. La réaction est laissée sous agitation 30 min à température ambiante. Le chlorure d'acétoxyacétyle (1,5 eq, 150  $\mu$ L, 1,392 mmole) et la triéthylamine (TEA, 1,5 eq, 194  $\mu$ L, 1,392 mmole) sont introduits goutte à goutte dans le milieu. La réaction est agitée la nuit à température ambiante puis arrêtée par addition d'une solution saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40  $\mu$ L). Le mélange réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est purifié par passage sur une colonne de silice (10 mL). Un dépôt sec du résidu est réalisé. Après rinçage en DCM pour ôter le chlorure d'acyle et la TEA en excès, l'élution du produit désiré se fait par un mélange DCM:MeOH 8:2. Le produit est repéré par CCM (ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:3:2). Les fractions contenant le produit sont évaporées. Le résidu est repris dans le MeOH (5 mL) et du NaOMe (0,1 eq, 5 mg, 0,093 mmole) est ajouté pour dé-O-acétyler le composé. Le mélange est agité 1h à température ambiante. La déacétylation est suivie par CCM. Le milieu réactionnel est ensuite passé sur résine échangeuse de cations (Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>)) pour ôter la TEA encore présente puis évaporé. Le produit final est dessalé par filtration sur gel (Bio-Gel P-2) et lyophilisé.

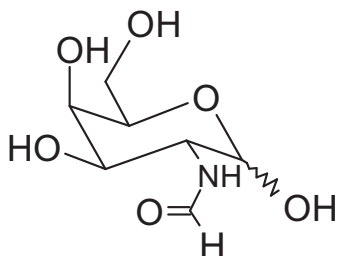
**Rendement : 50 % (110 mg)**

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O), mélange anomères  $\alpha$  et  $\beta$  :  $\delta$ =5,26 (d,  $J$  = 3,5 Hz, H<sub>1a</sub>), 4,74 (d,  $J$  = 8,5 Hz, H<sub>1b</sub>), 4,21 (dd,  $J$  = 3,5 Hz, 11 Hz, 1H), 4,17 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 4,15 (s, CH<sub>2a</sub>), 4,14 (s, CH<sub>2b</sub>), 4,11 (d,  $J$  = 7,5 Hz, 1H), 4,01 (dd,  $J$  = 3 Hz, 14 Hz, 1H), 3,96 (dd,  $J$  = 3 Hz, 6,75 Hz, 1H), 3,83 (dd,  $J$  = 3,5 Hz, 11 Hz, 1H), 3,78 (d,  $J$  = 6 Hz, 1H), 3,76 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3,71 (dd,  $J$  = 4 Hz, 8,25 Hz, 1H).

ESI-SM calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>7</sub>,  $M$ =237,21; trouvée : 238 [M + H]<sup>+</sup>, 260 [M + Na]<sup>+</sup>.

**N-formylgalactosamine**

(GalNHCHO)



Le chlorhydrate de galactosamine (100 mg, 0,466 mmole) est dissout dans de l'acide formique (3 mL) et agité au moins 5 h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:3:2). Le mélange est ensuite évaporé. Le résidu est repris dans l'eau (1 mL) et est passé sur résine échangeuse de cations (Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>)) pour éliminer la galactosamine qui n'a pas réagi. Après dessalage par filtration sur gel (Bio-Gel P-2), le produit est passé sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1X8 (OH<sup>-</sup>)) si besoin (s'il reste de l'acide formique) puis à nouveau dessalé par gel filtration. Le produit est enfin lyophilisé.

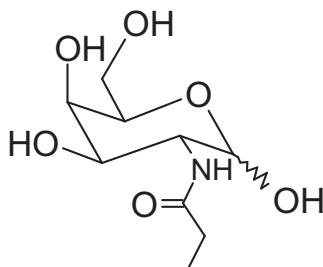
**Rendement** : 40 % (39 mg)

**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)**, mélange anomères  $\alpha$  et  $\beta$  :  $\delta$  8,2 (d,  $J$  = 26 Hz, H<sub>aformyl</sub>), 8,0 (d,  $J$  = 12 Hz, H<sub>Bformyl</sub>), 5,26 (d,  $J$  = 3,5 Hz, H<sub>1a</sub>), 4,70 (d,  $J$  = 8,5 Hz, H<sub>1B</sub>), 4,23 (dd,  $J$  = 3,5 Hz, 11 Hz, 1H), 4,12 (t,  $J$  = 6,5 Hz, 1H), 4,03 (d,  $J$  = 3,5 Hz, 1H), 4,01 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3,96 (dd,  $J$  = 3 Hz, 8,5 Hz, 1H), 3,92 (dd,  $J$  = 3,5 Hz, 11 Hz, 1H), 3,79 (dd,  $J$  = 5 Hz, 12,75 Hz, 1H), 3,76 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3,71 (dd,  $J$  = 4,5 Hz, 7,75 Hz, 1H).

**ESI-SM** calculée pour C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub>,  $M$ =207,18; trouvée : 208,1 [M + H]<sup>+</sup>, 230 [M + Na]<sup>+</sup>.

**N-propionylgalactosamine**

(GalNPr)

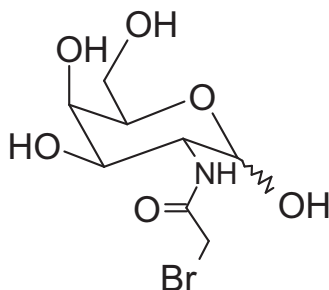


Le chlorhydrate de galactosamine (100 mg, 0,464 mmole) est dissout dans le MeOH (4 mL). Un équivalent de NaOMe (25 mg, 0,464 mmole) est ajouté. La réaction est laissée sous agitation 30 min à température ambiante. L'anhydride propionique (4 eq, 239  $\mu$ L, 1,856 mmole) est ajouté goutte à goutte et le mélange est agité la nuit à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:3:2). Le produit est passé sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1X8 (OH<sup>-</sup>)) pour ôter l'acide propionique restant puis dessalé par filtration sur gel (Bio-Gel P-2) et lyophilisé.

**Rendement** : 80 % (88 mg)

**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)**, mélange anomères  $\alpha$  et  $\beta$  :  $\delta$  5,23 (d,  $J$  = 3,5 Hz, H<sub>1 $\alpha$</sub> ), 4,66 (d,  $J$  = 8 Hz, H<sub>1 $\beta$</sub> ), 4,16 (d,  $J$  = 3,5 Hz, 1H), 4,13 (dd,  $J$  = 3 Hz, 6,75 Hz, 1H), 4,10 (d,  $J$  = 6,5 Hz, 1H), 4,0 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3,94 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3,92 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3,77 (d,  $J$  = 5,5 Hz, 1H), 3,75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3,71 (dd,  $J$  = 4 Hz, 8 Hz, 1H), 2,32 (q,  $J$  = 7,5 Hz, CH<sub>2 $\alpha$</sub> ), 2,31 (q,  $J$  = 7,5 Hz, CH<sub>2 $\beta$</sub> ), 2,13 (t,  $J$  = 7,5 Hz, CH<sub>3 $\alpha$</sub> ), 2,13 (t,  $J$  = 7,5 Hz, CH<sub>3 $\beta$</sub> ).

**ESI-SM** calculée pour C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>,  $M$ =235,24; trouvée : 236,2 [M + H]<sup>+</sup>, 258,4 [M + Na]<sup>+</sup>.

***N*-bromoacétylgalactosamine**(GalNHCOCH<sub>2</sub>Br)

Le chlorhydrate de galactosamine (200 mg, 0,928 mmole) est dissout dans le MeOH (8 mL) et 1 eq de NaOMe (50,1 mg, 0,928 mmole) est ajouté. Le mélange est agité 30 min à température ambiante. L'anhydride bromoacétique (1,5 eq, 180,97 mg, 1,392 mmole) et la triéthylamine (TEA, 1,5 eq, 194 µL, 1,392 mmole) sont introduits goutte à goutte dans le milieu. La réaction est agitée la nuit à température ambiante puis arrêtée par addition d'une solution saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 µL). Le mélange est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est déposé sur une colonne de silice (10 mL). Après rinçage en DCM pour ôter l'acide bromoacétique en excès, l'élution de la *N*-bromoacétylgalactosamine se fait dans un mélange DCM:MeOH 8:2, les fractions contenant le produit sont repérées par CCM (ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:3:2) puis évaporées. Le produit est ensuite passé sur résine échangeuse de cations (Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>)) pour éliminer la TEA puis dessalé par filtration sur gel (Bio-Gel P-2) et lyophilisé.

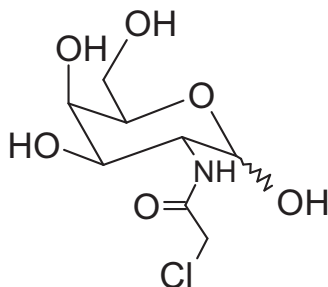
**Rendement : 70 % (195 mg)**

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O), mélange anomères α et β : δ 5,26 (d, *J* = 3,5 Hz, H<sub>1α</sub>), 4,69 (d, *J* = 8,5 Hz, H<sub>1β</sub>), 4,19 (s, CH<sub>2α</sub>), 4,08 (s, CH<sub>2β</sub>), 4,17 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 4,14 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 4,11 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,96 (dd, *J* = 1,5 Hz, 4,75 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 3,79 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 3,77 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 3,75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3,70 (dd, *J* = 4,5 Hz, 6,75 Hz, 1H).

ESI-SM calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>Br, *M*=300,11; trouvée : 299 et 301 [M + H]<sup>+</sup>, 322 [M + Na]<sup>+</sup>.

## ***N*-chloroacétylgalactosamine**

(GalNHCOCH<sub>2</sub>Cl)



Le produit est synthétisé et purifié selon le même protocole que celui suivi pour la *N*-bromoacétylgalactosamine mais à partir du chlorhydrate de galactosamine et de l'anhydride chloroacétique.

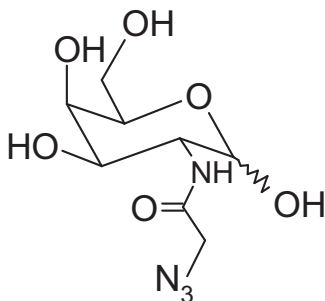
**Rendement :** 70 % (166 mg)

**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)**, mélange anomères α et β : δ 5,26 (d, *J* = 4 Hz, H<sub>1α</sub>), 4,72 (d, *J* = 8,5 Hz, H<sub>1β</sub>), 4,21 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 4,20 (s, CH<sub>2α</sub>), 4,05 (s, CH<sub>2β</sub>), 4,18 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 4,12 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 3,99 (dd, *J* = 3 Hz, 15 Hz, 1H), 3,95 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 3,92 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 3,80 (dd, *J* = 3,5 Hz, 10,7 Hz, 1H), 3,75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3,71 (dd, *J* = 4,5 Hz, 7,5 Hz, 1H).

**ESI-SM** calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>Cl, *M*=255,66; trouvée : 273,5 [*M* + H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>.

## ***N*-azidoacétylgalactosamine**

(GalNAz)



Le produit est synthétisé à partir de *N*-chloroacétylgalactosamine (150 mg, 0,59 mmole) dissoute dans du DMF anhydre (4 mL) puis le NaN<sub>3</sub> (226 mg, 3,48 mmoles) est ajouté. Après agitation la nuit à 50°C, le milieu réactionnel est co-évaporé avec de l'acétone conduisant à la précipitation du NaN<sub>3</sub> en excès qui est éliminé par filtration. Le produit est ensuite dessalé par filtration sur gel (Bio-Gel P-2) puis lyophilisé.

**Rendement : 76 % (137 mg)**

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O), mélange anomères α et β : δ=5,18 (d, *J* = 3,5 Hz, H<sub>1α</sub>), 4,63 (d, *J* = 8 Hz, H<sub>1β</sub>), 4,12 (dd, *J* = 5 Hz, 6,5 Hz, 1H), 4,06 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,03 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,01 (s, CH<sub>2</sub>, 4H), 3,93 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 3,87 (td, *J* = 3,9 Hz, 10,5 Hz, 1H), 3,74-3,66 (m, H<sub>6</sub>, 4H), 3,63 (dd, *J* = 3,9 Hz, 7,9 Hz, 1H).

ESI-SM calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, *M*=262,22; trouvée : 285,5 [M + Na]<sup>+</sup>.

### I.3 Autres analogues

Le ***N*-butyrylgalactosamine (GalNBu)** et le ***N*-isobutyrylgalactosamine (GalNiBu)** ont été synthétisés par Vanessa Bourdeaux (Bourdeaux, 2006) à partir de chlorhydrate de galactosamine et de *N*-hydroxysuccinimidyl butyrate pour le GalNBu et de l'acide isobutyrique pour le GalNiBu. Le **6-désoxy (6-deoxyGalNAc)** et le **4-désoxy-2-*N*-acétylgalactosamine (4-deoxyGalNAc)** ont été synthétisés par Mathieu Laurent (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans) et Vanessa Bourdeaux selon une méthode adaptée de la littérature (Busca *et al.*, 2004) et décrite dans la thèse de Vanessa Bourdeaux (Bourdeaux, 2006). Le **4-fluoro-2-*N*-acétylgalactosamine (4-fluoroGalNAc)** nous a été envoyé par le Dr W. Szarek (Queen's University, Kingston, Canada).

### I.4 Acétylation des analogues

Le sucre à acétyler (1 eq, 0,2 mmole) est dissout dans 2 mL de pyridine puis refroidi à 0°C dans un bain de glace. Douze équivalents par groupement hydroxyle libre d'anhydride acétique sont ajoutés. La réaction est laissée 5 h sous agitation dans le bain de glace et est suivie par CCM (éluant = DCM:MeOH, 8:2). Quand la réaction est finie, le milieu réactionnel est évaporé. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle puis lavé 3 fois avec de l'HCl 1M, 3 fois avec une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> et 1 fois avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub>. Le produit peracétylé est isolé par filtration puis évaporé (rendement : 66 %).

Les produits acétylés ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H, 500 MHz. L'attribution des pics a également nécessité une RMN à 2 dimensions <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY.

## Matériels et méthodes

$^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), mélange des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  :

### **N-acétylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,26 ( $\text{H}_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,73 ( $\text{H}_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 9$ ), 5,46 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 2,5$ ), 5,41 ( $\text{H}_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,27 ( $\text{H}_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 5,12 ( $\text{H}_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3, 11$ ), 4,79-4,75 ( $\text{H}_{2\alpha}$ , m, 1), 4,53-4,47 ( $\text{H}_{2\beta}$ , m, 1), 4,29-4,09 ( $\text{H}_5$  et  $\text{H}_6$ , m, 6), 2,21, 2,14, 2,07, 1,99 (4  $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$ , 24, s), 2,21-1,99 ( $\text{CH}_3$ , 6, m)

### **N-glycolylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,30 ( $\text{H}_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,75 ( $\text{H}_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 9$ ), 5,48 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 2,5$ ), 5,42 ( $\text{H}_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,32 ( $\text{H}_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3, 11,5$ ), 5,16 ( $\text{H}_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 4,75-4,70 ( $\text{H}_{2\alpha}$ , m, 1), 4,65-4,44 ( $\text{CH}_2$  et  $\text{H}_{2\beta}$ , m, 5), 4,29-4,06 ( $\text{H}_5$  et  $\text{H}_6$ , m, 6), 2,22-2,06 (5  $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$ , 30, m)

### **N-formylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  8,22 ( $\text{H}_{\text{aldéhyde}}$ , d, 1,  $J = 11,5$ ), 8,03 ( $\text{H}_{\text{aldéhyde}}$ , d, 1,  $J = 11$ ), 6,28 ( $\text{H}_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 4$ ), 5,77 ( $\text{H}_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 8,5$ ), 5,48 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 2$ ), 5,43 ( $\text{H}_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,29 ( $\text{H}_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 5,16 ( $\text{H}_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 4,88-4,83 ( $\text{H}_{2\alpha}$ , m, 1), 4,58-4,52 ( $\text{H}_{2\beta}$ , m, 1), 4,29-4,06 ( $\text{H}_5$  et  $\text{H}_6$ , m, 6), 2,22, 2,22, 2,18 (3  $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$ , s, 18), 2,09-2,07 ( $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$ , m, 6)

### **N-propionylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,26 ( $\text{H}_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,74 ( $\text{H}_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 9$ ), 5,47 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 2,5$ ), 5,41 ( $\text{H}_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,27 ( $\text{H}_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 5,12 ( $\text{H}_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3, 11,5$ ), 4,81-4,76 ( $\text{H}_{2\alpha}$ , m, 1), 4,55-4,50 ( $\text{H}_{2\beta}$ , m, 1), 4,29-4,04 ( $\text{H}_5$  et  $\text{H}_6$ , m, 6), 2,23-2,05 (4  $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$  et  $\text{CH}_2$ , 28, m), 1,15 ( $\text{CH}_3$ , dt, 6,  $J = 2,5, 7,5$ )

### **N-azidoacétylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,28 ( $\text{H}_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 4$ ), 5,82 ( $\text{H}_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 8,5$ ), 5,49 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 2$ ), 5,44 ( $\text{H}_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 2,5$ ), 5,30 ( $\text{H}_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 5,23 ( $\text{H}_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11,5$ ), 4,77-4,72 ( $\text{H}_{2\alpha}$ , m, 1), 4,46-4,40 ( $\text{H}_{2\beta}$ , m, 1), 4,30-4,07 ( $\text{H}_5$  et  $\text{H}_6$ , m, 6), 3,99, 3,97 ( $\text{CH}_2$ , s, 4), 2,23, 2,22, 2,21, 2,17, 2,09, 2,08, 2,07, 2,06 (4  $\text{OAc}_\alpha$  et  $\beta$ , 24, s)

**N-chloroacétylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,29 ( $H_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,85 ( $H_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 8,5$ ), 5,50 ( $H_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,44 ( $H_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,32 ( $H_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3, 11$ ), 5,26 ( $H_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11$ ), 4,75-4,70 ( $H_{2\alpha}$ , m, 1), 4,45-4,40 ( $H_{2\beta}$ , m, 1), 4,31-4,03 ( $H_5$  et  $H_6$ ,  $CH_2$ , m, 10), 2,22-2,06 (4  $OAc_{\alpha}$  et  $\beta$ , 24, m)

**N-bromoacétylgalactosamine peracétylée :**

$\delta$  6,26 ( $H_{1\alpha}$ , d, 1,  $J = 3,5$ ), 5,71 ( $H_{1\beta}$ , d, 1,  $J = 8,5$ ), 5,43 ( $H_{4\alpha}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,38 ( $H_{4\beta}$ , d, 1,  $J = 3$ ), 5,28 ( $H_{3\alpha}$ , dd, 1,  $J = 3, 11$ ), 5,12 ( $H_{3\beta}$ , dd, 1,  $J = 3,5, 11$ ), 4,64-4,40 ( $H_{2\alpha}$  et  $\beta$ , m, 2), 4,25-4,02 ( $H_5$  et  $H_6$ ,  $CH_2$ , m, 10), 2,18, 2,18, 2,16, 2,13, 2,09, 2,05, 2,03, 2,02 (4  $OAc_{\alpha}$  et  $\beta$ , 24, s)

## II. Synthèse enzymatique et caractérisation des dérivés saccharidiques

### II.1 Matériel

Les enzymes GK2 et AGX1 ont été produites dans des bactéries (*E.coli*) par Vanessa Bourgeaux lors de sa thèse au sein de l'équipe. La production d'une forme soluble de glycosyltransférase ppGalNAc-T1 bovine dans la levure et la purification de l'enzyme ont été réalisées par Véronique Piller. La phosphatase inorganique (PPi) et la créatine kinase (CK) ont été achetées chez Sigma. La calf intestinal phosphatase (CIP) vient de New England Biolabs (10000 U/mL). La créatine phosphate (CP) provient de chez Fluka, l'ATP et l'UTP de chez Sigma.

Les peptides (STP)<sub>5</sub>AG et PADRE chimique (aKXVAAWTKaA, X étant la cyclohexexylalanine) ont été synthétisés par Philippe Marceau et Isidore Decostaire dans l'équipe d'Agnès Delmas (CBM, Orléans). L'expression dans les bactéries du MUC1<sub>8</sub> recombinant et de ses dérivés puis leur purification ont été réalisées par Nicole Bureau.

Les gels de Sephadex (G-10, G-25, Hi-Trap, etc...) proviennent de Pharmacia/GE.

La colonne d'HPLC est une C18 nucléosil de chez Varian.

La résine de NiNTA vient de chez Qiagen.

**MUC1 :**

PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA

**MUC1<sub>8</sub> : 16500 Da**

MHHHHH<sup>AS</sup>(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)<sub>8</sub>MRM

**MUC1<sub>8</sub> PADRE : 17887 Da**

MHHHHH<sup>AS</sup>(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)<sub>8</sub>MRCaKXVAAWTKaA

**MUC1<sub>9</sub>KK2epiT (désigné par MUC1<sub>9</sub> par la suite) : 23362 Da**

MHHHHH<sup>AS</sup>ARKKWKKAS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)<sub>9</sub>ALGSTAPPVHNVTSA  
TSKKWKKPSMRM

**(STP)<sub>5</sub>AG : 1571 Da**

STPSTPSTPSTPSTPAG

## II.2 Synthèse enzymatique de sucre-1P et d'UDP-sucres

(Bourgeaux *et al.*, 2005)

### II.2.1 Synthèse de sucre-1P

Les analogues sont incubés à une concentration de 10 mM finale dans un mélange réactionnel contenant la SAB (1 mg/mL),  $MgCl_2$  (5 mM), ATP (3 mM), GK2 (28  $\mu$ g/mL) dans un tampon Tris/HCl (75 mM, pH 8,5). Après incubation la nuit à 37°C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 10 mL d'eau/MeOH (1/1). Le mélange est passé à travers une colonne de résine échangeuse d'anions (Dowex 1X8 ( $Cl^-$ )) pour retenir les différentes espèces chargées négativement comme le sucre-1P, l'ATP et l'ADP. Après rinçage de la colonne avec  $NH_4HCO_3$  (25 mM), le produit est élué sélectivement par  $NH_4HCO_3$  (100 mM). Le sucre-1P est ensuite dessalé par filtration sur Sephadex G-10.

### II.2.2 Synthèse d'UDP-sucre

Les analogues sont incubés la nuit à 37°C à 5, 10 ou 15 mM selon l'affinité des analogues pour les enzymes GK2 et AGX1. Le mélange réactionnel contient de l'UTP (2,8 mM), ATP (4 mM), SAB (1 mg/mL),  $MgCl_2$  (5 mM), GK2 (28  $\mu$ g/mL), AGX1 (9,4  $\mu$ g/mL), PPi (1,6  $\mu$ g/mL) dans un tampon Tris/HCl (75 mM, pH 8,5). La réaction est arrêtée par l'ajout d'un volume de MeOH et les enzymes sont précipitées pendant 1 h dans la glace. Après centrifugation, le produit est purifié par passage sur Hi-Trap QXL (5 mL) et élution par un gradient en  $NH_4HCO_3$  (50 à 250 mM en 400 mL, 3 mL/min). Les UDP-sucres sont récupérés et dessalés sur Sephadex G-10, Ils sont ensuite purifiés par HPLC (C18, isocratique 20 mM ATEA, 3 mL/min) puis à nouveau dessalés sur G-10, Les UDP-sucres sont caractérisés par RMN  $^1H$ , 500 MHz et spectrométrie de masse (électrospray). Les méthodes de FPLC et d'HPLC sont décrites dans le paragraphe VI.

## II.3 Synthèse enzymatique de glycoconjugués

(Bourgeaux *et al.*, 2007)

### II.3.1 Synthèse à partir des UDP-sucres

Les différents UDP-sucres sont incubés à 2 mM à 37°C dans un mélange STP<sub>5</sub>(AG) (0,4 mM) or MUC1<sub>9</sub> (0,06 mM), DTT (2 mM), SAB (0,2 mg/mL), MnCl<sub>2</sub> (15 mM), ppGalNAc T1 (30 µg/mL) en tampon MES (50 mM, pH 6,5). La CIP (5,72 µg/mL) est ajoutée après 6 h et la ppGalNAc T1 (9,23 µg/mL) et l'UDP-sucre (2 mM) sont rajoutés après 7 h. L'incubation est poursuivie jusqu'à 24 h. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 1 volume de MeOH afin de précipiter les enzymes 1 h dans la glace. Après centrifugation, les produits sont dialysés puis analysés en spectrométrie de masse (MALDI) et par gel SDS-PAGE (8 % acrylamide) pour MUC1<sub>9</sub>.

### II.3.2 Synthèse avec tout le cycle enzymatique

Les analogues sont incubés la nuit à 37°C entre 5 et 20 mM dans un mélange GK2 (21 µg/mL), AGX1 (1,6 µg/mL), PPi (9,8 µg/mL), CK (10,6 µg/mL), ppGalNAc T1 (12 µg/mL), SAB (1 mg/mL), glycérol (5 % en volume), CP (20 mM), UTP (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), peptide (0,6 mM pour (STP)<sub>5</sub>AG et 60 µM pour MUC1<sub>8</sub>) dans un tampon Imidazole (75 mM, pH 7). Les peptides glycosylés sont purifiés par dialyse dans le cas de (STP)<sub>5</sub>AG ou par chromatographie d'affinité sur NiNTA pour MUC1<sub>8</sub>. Après dessalage les glycoprotéines sont analysées par spectrométrie de masse (MALDI) et par gel SDS-PAGE (12 % acrylamide) pour MUC1<sub>8</sub>.

### III. Caractérisation biochimique des dérivés saccharidiques

#### III.1 Matériel

Nous avons utilisé des cellules HEK transfectées par Friedrich Piller avec un vecteur d'expression eucaryote (pcDNA3, Invitrogen) codant une forme soluble de la GalNAc B1,3-galactosyltransférase (C1GalT) de drosophile (Yoshida *et al.*, 2008). Le milieu des cellules est récupéré 48 h après transfection et utilisé directement pour l'activité enzymatique.

Un milieu de culture de cellules d'insectes Sf9 transfectées par un vecteur pacGP67 (baculovirus transfer vector BD Biosciences) codant une forme soluble de la sialyltransférase ST6GalNAc I (Marcos *et al.*, 2004) nous a été fourni par le Dr Anne Harduin Lepers, UMR 8576, Université de Lille.

Le compteur de radioactivité est un compteur à scintillation Microbeta (Perkin Elmer) et les différentes sources radioactives viennent de chez Perkin Elmer et Amersham.

Les lectines utilisées en ELISA sont les lectines biotinylées VVA (*Vicia villosa agglutinin*), SBA (*Soybean agglutinin*), *Wisteria floribunda*, *Griffonia simplicifolia lectin I*, PNA (*Peanut agglutinin*) de chez Vector ; HPA (*Helix pomatia*) de chez Sigma et SSA (*Salvia sclarea*) purifiée par Véronique Piller et biotinylée à l'aide de NHS-biotine. L'Extravidine couplée à l'HRP (« HorseRadish Peroxydase », peroxydase du raifort) de Sigma (E-2886) est ensuite utilisée comme agent de reconnaissance de la biotine.

Les anticorps anti-Tn sont des milieux de culture fournis par le Dr Ulla Mandel, Department of Oral Diagnostics, School of Dentistry, Faculty of Health Sciences, Université de Copenhague.

#### III.2 Tests enzymatiques

##### III.2.1 Calcul de la constante de Michaelis pour GK2

Les différents analogues sont incubés 20 min à 37°C à différentes concentrations dans un tampon Tris/HCl (75 mM, pH 8,5) en présence de MgCl<sub>2</sub> (5 mM), SAB (1 mg/mL), [<sup>32</sup>P]ATP (500 μM, 10000 cpm/nmole), GK2 (4,2 μg/mL). La réaction est arrêtée par dilution avec de l'eau et le milieu réactionnel est passé sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>)). Les sucres-1P, produits de la réaction, sont élués par NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM. L'activité de l'enzyme est déterminée par mesure de la radioactivité

dans les fractions d'élution. Chaque expérience est répétée au moins 3 fois pour chaque analogue.

### III.2.2 Calcul de la constante de Michaelis pour AGX1

Les différents analogues sont incubés 60 min à 37°C à différentes concentrations dans 25 µL de tampon Tris/HCl (75 mM, pH 8,5) en présence de MgCl<sub>2</sub> (5 mM), SAB (1 mg/mL), [H<sup>3</sup>]UTP (4 mM, 600 cpm/nmole), AGX1 (3,8 µg/mL) and PPA (1,6 µg/mL). La réaction est arrêtée par dilution avec de l'eau et le milieu réactionnel est passé sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>)). Les UDP-sucres, produits de la réaction, sont élués par NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 330 mM. L'activité de l'enzyme est déterminée par mesure de la radioactivité dans les fractions d'élution. Chaque expérience est répétée au moins 3 fois pour chaque analogue.

### III.2.3 Test enzymatique sur le système « GK2+AGX1 »

Les analogues sont incubés 15 h à 37°C à 3 mM dans 25 µL de tampon Tris/HCl (75 mM, pH 8,5) en présence de GK2 (4,2 µg/mL), AGX1 (3,8 µg/mL), PPA (1,6 µg/mL), SAB (1 mg/mL), ATP (5 mM), [<sup>32</sup>P]ATP (500 cpm/nmole), UTP (4 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM). La réaction est arrêtée par dilution avec de l'eau et le milieu réactionnel est passé sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>)). Les différents produits de réaction sont élués par NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM pour les sucres-1P et 330 mM pour les UDP-sucres). La mesure de la radioactivité des fractions d'élution permet d'évaluer la quantité des différentes espèces formées. Chaque expérience est répétée au moins 3 fois pour chaque analogue.

### III.2.4 Test enzymatique sur la GalNAc B1,3-galactosyltransférase (C1GalT)

Dix µg de glycopeptide (MUC1, glycosylé par différents analogues) sont incubés dans 25 µL de tampon MES (50 mM, pH 6,5) en présence de MnCl<sub>2</sub> (15mM), SAB (0,1 mM), DTT (1mM), UDP[<sup>14</sup>C]Gal (1 mM, 25000 cpm par test) et 5 µL de milieu de culture contenant l'enzyme. La réaction est placée 30 à 60 min à 37°C. Après incubation, 750 µL d'eau sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le milieu réactionnel est ensuite passé à travers une colonne de Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>) (2-3 mL) qui retient l'UDP[<sup>14</sup>C]Gal en excès. La colonne est rincée par de l'eau. Les fractions de rinçage sont comptées afin de déterminer la quantité de galactose incorporée dans le peptide. Un témoin sans peptide permet la mesure de la radioactivité due à la dégradation de l'UDP-Gal en UDP+Gal.

### III.2.5 Test enzymatique sur la Sialyltransférase (ST6GalNAc1)

Dix µg de glycopeptide (MUC1, glycosylé par différents analogues) sont incubés dans un tampon MES (50 mM, pH 6,5) en présence de Triton TX-100 (0,8 %), SAB (0,15 mM), CMPNeuAc (0,5 mM), CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc (1 mM, 25000 cpm par test) et 5 µL de solution d'enzyme dans 25 µL. La réaction est placée la nuit à 37°C. Après incubation, 100 µL d'eau sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le peptide sialylé est séparé du CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc sur une colonne de G-25 (9 mL) dans le NaCl (300 mM). Les différentes fractions sont comptées afin de calculer la quantité des différents produits.

### III.3 ELISA avec des lectines

Des plaques 96 puits sont recouvertes par différentes quantités de MUC1, glycosylé (jusqu'à 400 ng en peptide soit jusqu'à 60 ng en sucres selon l'analogue) dans le tampon carbonate bicarbonate (50 µL, 200 mM, pH 9,6). Les plaques sont incubées la nuit à température ambiante. Après 3 lavages successifs en TBS 0,1 % Tween 20 (200 µL), une saturation est réalisée par l'ajout de 150 µL de TBS 0,5 % Tween 20 suivi d'une incubation 30 min à 37°C. Les plaques sont ensuite rincées 3 fois par du TBS Métaux (TBS + 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>) 0,1 % Tween 20, Puis la lectine est ajoutée (50 µL dans TBS Métaux 0,1 % Tween 20). Différentes lectines ont été testées : VVA (diluée au 1/2000 soit 1 µg/mL), HPA (au 1/1000 soit 1 µg/mL), SBA (au 1/2000 soit 0,5 µg/mL), Wisteria (au 1/2000 soit 1 µg/mL), Griffonia (au 1/1000) et SSA (1/500 soit 1,3 µg/mL). Les plaques sont ensuite incubées 1 h à 37°C. Après 3 lavages au TBS 0,1 % Tween 20, l'Extravidine couplée à l'HRP est ajoutée (50 µL, diluée au 1/5000° en TBS 0,1 % Tween 20). Les plaques sont ensuite laissées 1 h à température ambiante puis rincées 3 fois avec du TBS 0,1 % Tween 20, Enfin l'ABTS (0,2 mg/mL dans tampon acétate / acide acétique (100 mM, pH 5), 100 µL), substrat de la peroxydase, est ajouté en présence d'eau oxygénée 30 % (0,2 µL par puits) pour une incubation de 20 min à 30°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 µL d'acide oxalique 0,2 %. La plaque est lue par spectrophotométrie (Victor, Perkin Elmer) à 405 nm. L'absorbance permet d'évaluer la quantité des différentes lectines spécifiques du GalNAc fixées sur les peptides glycosylés par les analogues.

### III.4 Test sur MGL-2

#### III.4.1 Production de MGL-2

Une forme soluble de MGL-2 murine a été produite par Zakaria Djebbari lors de son stage de Master 2 dans l'équipe. La production d'une protéine chimère « lectine-anticorps » a été réalisée qui comporte une partie lectine MGL-2 reconnaissant l'antigène Tn et un fragment Fc d'anticorps de souris. L'ADN codant pour cette protéine chimère a été produit à partir d'ADNc codant pour mMGL-2 et pour le fragment Fc des IgG (Sigma) introduit en phase dans le vecteur pcDNA3B (In vitrogen). Des cellules HEK-293 ont été transfectées par l'ADN purifié et le milieu de culture exprimant la lectine a été directement utilisé par la suite.

#### III.4.2 ELISA sur MGL-2

Les plaques sont recouvertes par différentes quantités de MUC1, glycosylé (jusqu'à 400 ng en peptide soit jusqu'à 60 ng en sucres selon l'analogue) dans le tampon carbonate bicarbonate (50  $\mu$ L, 200 mM, pH 9,6) puis incubées la nuit à température ambiante. Après 3 lavages successifs en TBS 0,1 % Tween 20 (200  $\mu$ L), une saturation est réalisée par l'ajout de 150  $\mu$ L de BSA 1 % dans TBS Métaux. Les plaques sont incubées 30 min à 37°C et ensuite rincées 3 fois par du TBS Métaux 0,1 % Tween 20. Cinquante  $\mu$ L milieu de culture sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées 2 h à 4°C. Après 3 lavages au TBS 0,1 % Tween 20, une solution d'anticorps de chèvre anti IgG (H+L) de souris couplés à la peroxydase (1/2000 dans du TBS Métaux 0,05 % Tween20, 50 $\mu$ L) est ajoutée pour 1 h à 37°C. Après 3 rinçages avec du TBS 0,1 % Tween 20, l'ABTS (0,2 mg/mL dans tampon acétate / acide acétique (100 mM, pH 5), 100  $\mu$ L), substrat de la peroxydase est ajouté en présence d'eau oxygénée (0,2  $\mu$ L par puits) pour une incubation de 20 min à 30°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 50  $\mu$ L d'acide oxalique 0,2 %. La plaque est lue par spectrophotométrie (Victor, Perkin Elmer) à 405 nm. L'absorbance permet d'évaluer la quantité de lectine fixée sur les peptides glycosylés par les analogues.

### III.5 ELISA sur anti-Tn

Cent ng des différents MUC glycosylés sont déposés dans les puits dans le tampon carbonate bicarbonate (200 mM, pH 9,6, 50 $\mu$ L). La plaque est laissée la nuit à 4°C puis

## Matériels et méthodes

rincée 3 fois par du PBS 0,25 % Tween 20 (200µL). La saturation est réalisée par l'ajout de SAB (5 % dans PBS, 150 µL). La plaque est incubée 1 h à température ambiante, rincée en PBS 0,25 % Tween 20 puis les anticorps anti-Tn sont ajoutés (1/8 dans PBS, 50 µL). La plaque est incubée 2 h à température ambiante puis rincée et la solution d'anticorps de chèvre anti IgG (H+L) de souris couplés à la peroxydase (1/1000 dans du PBS, 50µL) est ajoutée pour une incubation de 2 h à température ambiante. Après rinçage, l'ABTS (0,2 mg/mL dans un tampon acétate / acide acétique (100 mM, pH 5), 100 µL), substrat de la peroxydase est ajouté en présence d'eau oxygénée (0,2 µL par puits) pour une incubation de 20 min à 30°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 µL d'acide oxalique 0,2 %. La plaque est lue par spectrophotométrie (Victor, Perkin Elmer) à 405 nm. L'absorbance permet de déterminer la quantité d'anticorps fixés.

## IV. Tests immunologiques sur des souris

### IV.1 Matériel

Pour le couplage sur KLH, les agents de couplage font partie du kit SureLINK™ de KPL. La KLH a été isolée de la lymphe du mollusque *Megathura crenulata* (Sigma, H 7017).

Pour le couplage sur SAB, le GMBS provient de Calbiochem, la SAB et le TCEP de chez Sigma.

Les unités de filtration centrifuge viennent de Vivascience.

Pour les injections, les adjuvants sont de chez Sigma (Adjuvant de Freund) et Pierce (Alum).

Les anticorps couplés à la peroxydase utilisés en ELISA proviennent de Bio-Rad pour la solution d'anticorps de chèvre anti IgG (H+L) de souris et de Jackson Immuno Research pour la solution d'anticorps de chèvre anti IgM de souris.

### IV.2 Couplage sur une protéine porteuse

#### IV.2.1 Couplage sur KLH

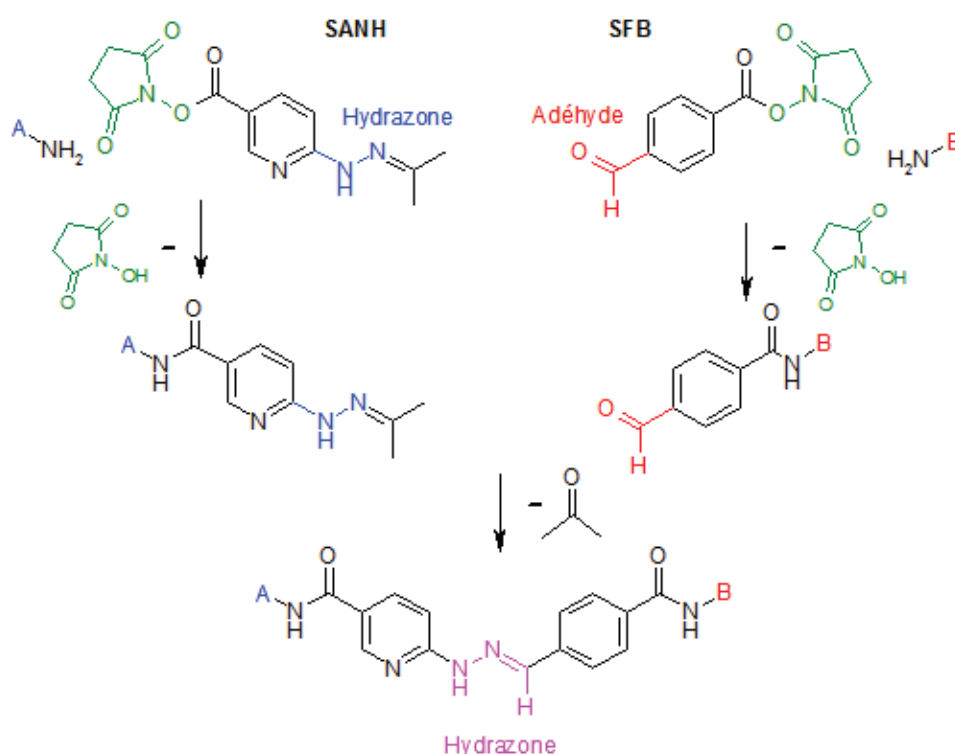
Le peptide (STP)<sub>5</sub>AG glycosylé ou non (250 eq) et la molécule SFB dissoute dans le DMSO (2500 eq) sont incubés 1 h à température ambiante en tampon phosphate (100 mM, pH 7,3), NaCl (150 mM). Le peptide est ensuite purifié par filtration sur gel (Bio-Gel P-2) dans l'eau. La KLH (1 eq, 1 mg/100 µL) est incubée en présence de la molécule SANH (1000 eq) 1 h à température ambiante en tampon phosphate (100 mM, pH 7,3), NaCl (150 mM). Le SANH en excès est éliminé par diafiltration sur une membrane de porosité 10 KDa. Le peptide modifié par SFB et la KLH modifiée par SANH sont ensuite incubés ensemble en tampon phosphate (10 mM, pH 6,0), NaCl (150 mM), sur la nuit, à 4°C. Le produit de couplage est séparé par diafiltration sur une membrane de porosité 10 KDa (figure 32).

#### IV.2.2 Quantification et caractérisation du couplage

La réaction de modification du peptide par SFB peut être quantifiée à l'aide d'une solution de 2-hydrazinopyridine.2HCl (2 mg/100 µL de tampon de conjugaison, pH 6,0). Cette solution est ajoutée au peptide modifié et incubée 1 h à 37°C. Le peptide modifié

par SFB avant couplage et le peptide modifié par SFB non couplé sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 350 nm par rapport au blanc préparé par l'addition de la solution de 2-hydrazinopyridine.2HCl à du tampon de couplage. Par différence entre les 2 valeurs obtenues, la quantité de peptide modifié par SFB et fixé sur KLH peut être estimée.

La caractérisation des produits de couplage est réalisée par la mesure du spectre d'absorbance (220-350 nm) et par gel SDS-PAGE (5 %) ou par Dot-Blot (révélé par VVA).

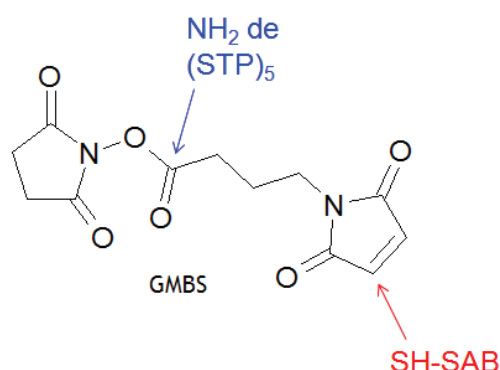


**Figure 32.** Conjugaison de STP<sub>5</sub> glycosylé ou non (B) sur KLH (A).

### IV.2.3 Couplage sur SAB

Le peptide STP<sub>5</sub> glycosylé ou non (200 eq) est dissout dans le tampon de couplage (phosphate 100 mM, pH 8, 25  $\mu$ L pour 200 nmoles de peptide). Il peut être nécessaire de chauffer le peptide à 50°C pour avoir une complète dissolution. Le GMBS (2000 eq) dissout dans le minimum de DMSO est ajouté au peptide. La réaction est laissée 1 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite complété à 100  $\mu$ L par l'ajout de tampon phosphate puis il est déposé sur une colonne de gel filtration (Bio-Gel P-2, 10 mL) équilibrée en tampon phosphate. La sortie du produit est suivie par mesure du spectre d'absorbance entre 200 et 350 nm. Pendant ce temps, la SAB (1 eq dans tampon phosphate) est traitée au TCEP (5 mM) pendant 2 h à température ambiante. Le TCEP est éliminé par diafiltration, technique qui permet aussi le passage de la SAB en tampon phosphate (100 mM, pH 8, EDTA 2 mM). La SAB traitée au TCEP est ensuite ajoutée au

peptide-GMBS. La réaction est laissée la nuit à 4°C. Le lendemain, le peptide non couplé est éliminé par diafiltration sur une membrane de porosité 10 kDa. Le couplage est vérifié sur gel SDS-PAGE (figure 33).



**Figure 33.** Schéma du couplage de STP<sub>5</sub> sur la BSA par l'agent de couplage GMBS.

### IV.3 Immunisation des souris

L'immunisation des souris a été réalisée avec l'aide de Nicole Bureau.

Chaque produit est injecté à un lot de 5 souris. Pour les MUC1<sub>8</sub>, 25 µg sont injectés en présence d'alum et pour les KLH-STP<sub>5</sub>, 5 µg de STP<sub>5</sub> en présence de l'adjuvant de Freund (complet pour la première injection, incomplet pour les suivantes) par souris et par injection. Chaque souris reçoit 4 injections à 3 semaines d'intervalle. Les prélèvements sanguins sont effectués 2 semaines après chaque injection dans le sinus rétro-orbital. Les sérums sont congelés à -20°C.

### IV.4 ELISA

Pour doser la réponse immune après les injections de MUC1<sub>8</sub>, 50 ng par puits de MUC1<sub>8</sub> sont adsorbés dans le tampon carbonate bicarbonate (200 mM, pH 9,6, 50µL). Pour les injections de KLH-STP<sub>5</sub>, 10 ng de BSA-STP<sub>5</sub> sont déposés. La plaque est ensuite incubée la nuit à température ambiante puis rincée 3 fois avec 200 µL de PBS. Une solution à 1 % de gélatine dans du PBS (150 µL par puits) est ajoutée afin d'éviter une interaction non spécifique. La plaque est placée 30 min à 37°C puis rincée 3 fois avec 200 µL de PBS 0,25 % Tween 20, les sérums sont dilués dans du PBS et déposés dans les puits (50 µL). La plaque est recouverte d'un film plastique et placée 1 h à 37°C. La plaque est à nouveau rincée 3 fois avec 200 µL de PBS 0,25 % Tween 20 avant addition d'une solution d'anticorps de chèvre anti IgG (H+L) ou anti IgM de souris couplés à la peroxydase (1/3000 dans du PBS,

## Matériels et méthodes

50µL). La plaque est incubée 1 h à 37°C puis rincée 3 fois par 200 µL de PBS 0,25 % Tween 20 et 2 fois par du PBS. L'ABTS (0,2 mg/mL dans tampon acétate / acide acétique (100 mM, pH 5), 100 µL), substrat de la peroxydase est ajouté en présence d'eau oxygénée (0,2 µL par puits) pour une incubation de 20 min à 30°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 µL d'acide oxalique 0,2 %. La plaque est lue par spectrophotométrie (Victor, Perkin Elmer) à 405 nm. L'absorbance permet de déterminer la quantité d'immunoglobulines fixées.

## V. Incorporation des analogues dans les cellules

### V.1 Matériel

Les cellules utilisées pour les expériences sont des cellules CHO IdID semi-confluentes cultivées en milieu F12-K, Penicilline Streptomycine 1 % SVF (sérum de veau foetal) 10 %.

Les cellules sont cultivées par la suite avec des sucres peracétylés (à partir d'une solution à 50 mM dans le DMSO).

Les lectines utilisées en FACS et en microscopie confocale sont les lectines biotinylées VVA (*Vicia villosa agglutinin*) et PNA (*Peanut agglutinin*) ainsi que ces mêmes lectines couplées au FITC de chez Vector. L'Avidine Alexa 568 vient de chez Molecular Probes.

Les anticorps anti-Tn sont des milieux de culture fournis par le Dr Ulla Mandel, Department of Oral Diagnostics, School of Dentistry, Faculty of Health Sciences, Université de Copenhague.

### V.2 Techniques de FACS et de microscopie confocale

La cytométrie en flux (FACS) est une technique qui permet de caractériser des cellules en suspension (dénombrement, tri, isolement). Les cellules sont d'abord spécifiquement marquées par un fluorochrome puis elles sont entraînées individuellement dans un flux laminaire vers un détecteur optique et dénombrées. L'appareil utilisé est le FACSort (Becton Dickinson), équipé d'un laser Argon (raie principale d'émission à 488 nm). Son système permet la détection simultanée de 5 paramètres (taille, granulosité et fluorescences à 3 longueurs d'onde d'émission).

La microscopie confocale est une technique qui permet de réaliser des images à divers plans de profondeur dits plans focaux (épaisseur ~ 1  $\mu\text{m}$ ) à l'aide d'un diaphragme. Pour l'observation des cellules CHO marquées, le microscope a été utilisé en fluorescence. Un rayon laser permet d'exciter les cellules marquées par le fluorochrome. Il y a alors émission de rayons fluorescents. Par divers filtres, un seul plan peut être étudié. Pour les fluorochromes employés, la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm pour le FITC et de 543 nm pour l'Alexa Fluor et la longueur d'onde d'émission respective de 510 à 542 nm et de 542 à 592 nm. La plateforme d'imagerie confocale est équipée d'un système LSM 510 Meta (ZEISS), doté d'un laser Argon ( $\lambda_{\text{ex}}$  458 nm, 477 nm, 488 nm et 514 nm) et de 2 lasers Hélium-Néon ( $\lambda_{\text{ex}}$  543 nm et 633 nm). Il est associé à un microscope AXIOVERT 200 avec

une source de lumière propre (lampe à mercure à arc court FLUOARC). Enfin, le statif inversé est équipé d'un objectif 10x et de trois objectifs à immersion 40x, 63x et 100x.

### V.3 Culture cellulaire en présence de sucre

(réalisée avec l'aide de Friedrich Pillar)

Les cellules ont été préalablement cultivées en milieu Ham's F12 modifié par Kaighn (F-12K) comportant 3% de sérum de veau fœtal (SVF). Deux jours avant l'expérience, les cellules sont ensemencées à  $\sim 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans le même milieu. Pour cela le milieu est éliminé des boîtes. Les cellules sont lavées par 3 mL de PBS (pour une boîte de 10 cm de diamètre) puis le PBS est éliminé et les cellules reçoivent 1 mL d'une solution de trypsine (0,05 % final, trypsine au 1/10 dans PBS/EDTA). Les boîtes sont placées 5 min à 37°C puis la réaction est arrêtée par 2 mL de milieu de culture F-12K. Le contenu des boîtes est versé dans un tube et centrifugé (10 min à 600 g). Le culot est repris dans 2 mL de milieu F-12K. Après comptage des cellules, du milieu F-12K est rajouté (5 mL pour les boîtes de 6 cm de diamètre et 10 mL pour celle de 10 cm). La suspension est ensuite répartie dans des boîtes (100  $\mu\text{L}$  pour les boîtes de 6 cm de diamètre et 300  $\mu\text{L}$  pour celles de 10 cm). Après 24 h dans l'étuve à 5%  $\text{CO}_2$  le milieu F-12K 3% SFV est ôté et remplacé par un milieu sans sérum constitué d'Excell CHO complémenté avec 1% de supplément ITS<sup>+1</sup> (tous les deux vendus par Sigma). Après 24 h dans ce milieu, les divers sucres sont ensuite ajoutés dans les boîtes (12,5  $\mu\text{M}$  pour la peracétyl GalNAc ou ses analogues peracétylés, 20  $\mu\text{M}$  pour le galactose ou 200  $\mu\text{M}$  pour le GalNAc). Les boîtes sont incubées la nuit.

### V.4 Marquage par des lectines

#### V.4.1 Observation par FACS

Le milieu est retiré des boîtes puis les cellules sont lavées dans du PBS et décollées du fond par l'ajout de trypsine (500 $\mu\text{L}$ ) suivi d'une incubation 5 min à 37°C. Deux mL de milieu F-12K sont ajoutés pour arrêter la trypsinolyse puis les cellules en suspension sont mises dans un tube et centrifugées (10 min, 600 g). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 2 mL de PBS contenant 0,2 % d'azide. Les cellules sont réparties dans des tubes à hémolyse (500  $\mu\text{L}$  / tube). Les tubes sont centrifugés 10 min à 600 g. Le surnageant est enlevé. Les lectines (VVA-FITC, 2 mg/mL et PNA-FITC, 1 mg/mL) diluées au 1/200 dans le milieu de culture F-12K sont réparties dans les tubes (50  $\mu\text{L}$ ) et les cellules

sont incubées 1 h à 4°C. Deux mL de PBS sont ajoutés et les tubes sont à nouveau centrifugés 10 min à 600 g afin d'éliminer les lectines en excès. Le surnageant est enlevé. Cinq cent µL de PBS 0,02 % azide sont ajoutés et les tubes sont analysés par FACS.

### V.4.2 Observation au microscope confocal

Les cellules ont été au préalable ensemencées dans des plaques de culture à 24 puits (au lieu des boîtes de 6 ou 10 cm de diamètre) au fond desquels des lamelles de verres stériles ont été déposées. Après l'incubation d'une nuit en présence de sucres d'intérêt, le milieu de culture est retiré et les cellules sont fixées sur les lamelles par l'ajout de PBS 3 % paraformaldéhyde à température ambiante pendant 10 min. Puis elles sont rincées au PBS avant de réaliser la saturation en PBS 0,2 % SAB 10 min à température ambiante. Les glycoconjugués présents à la surface des cellules sont ensuite éventuellement désialylés par l'ajout de neuraminidase (enzyme de *Vibrio cholerae*, 5 mU) en tampon acétate, 50 mM pH 5,5 NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, SAB 0,01 % (300 µL par puits). Après 30 min à température ambiante, le tampon est retiré et les cellules sont rincées 1 fois en PBS 0,2 % SAB. Les cellules désialylées ou non peuvent ensuite être marquées par les lectines. Dans un premier temps, la PNA-biotine est ajoutée (300 µL / puits) à une concentration de 10 µg/mL dans le PBS 0,2 % BSA, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et 0,1 % saponine si les cellules sont perméabilisées. La plaque est incubée 45 min à température ambiante. Après un rinçage au PBS 0,2 % SAB, VVA-FITC (4 µg/mL) et Avidine-Alexa 568 (2 µg/mL) sont ajoutées dans 300 µL de PBS, 0,2 % SAB, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et 0,1 % saponine. La plaque est incubée 45 min à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 2 fois au PBS puis les lamelles montées sur une lame dans un mélange Dabco 10% dans le PBS/Glycérol, 1 vol/1 vol (anti-oxydant et anti-desséchant) et scellées au vernis à ongles avant d'être observées au microscope.

## V.5 Marquage par des anti-Tn

Le même protocole a été employé sur des cellules CHO IdID cultivées en présence des sucres pour vérifier la reconnaissance des glycanes formés par un anticorps anti-Tn. Après traitement par la neuraminidase, les cellules ont été marquées par l'anticorps 5F4 en utilisant directement le milieu de culture contenant l'anticorps.

## V.6 Marquage par des anti-sérums

Certains anti-sérums ont été testés en FACS sur les cellules CHO IdID cultivées en présence des sucres. Le même protocole utilisé lors du marquage des cellules par les lectines a été employé avec une dilution aux 1/200 des anti-sérums.

## VI. Techniques de purification et d'analyses biochimiques

### VI.1 Chromatographie échangeuse d'ions

#### VI.1.1 Résine d'échanges d'ions

Deux types de résine Dowex ont été utilisés : les résines échangeuses de cations (50X8,  $H^+$ ) et échangeuses d'anion (1X8,  $Cl^-$  ou  $OH^-$ ). Les résines vont retenir les espèces chargées et les espèces non chargées ne sont pas retenues. Ces résines ont notamment été utilisées dans la purification des analogues de la GalNAc soit pour éliminer la galactosamine (chargée positivement elle est retenue par la Dowex 50X8) soit l'acide (chargé négativement il est retenu par la Dowex 1X8). Les analogues ne sont pas chargés et ne sont pas retenus par aucune des 2 résines utilisées.

#### VI.1.2 FPLC

Pour la purification des UDP-analogues, une colonne Hi-Trap QXL 5 mL (Amersham Biosciences) a été employée. Il s'agit d'une chromatographie échangeuse d'anions. La colonne est connectée à un système Äkta (Pharmacia / Amersham Biotechniques / GE) avec détection UV à 254 nm. Après réaction les espèces en présence (dont l'UDP-sucres) sont chargées négativement. Le mélange est déposé sur la colonne en 5 %  $NH_4HCO_3$  et est alors séparé à l'aide d'un gradient en  $NH_4HCO_3$  1M (de 5 à 25 % sur 400 mL).

### VI.2 HPLC

Les UDP-sucres, après FPLC, ont été purifiés par HPLC en phase inverse sur une colonne C18 (nucléosil, 300 Å, 5  $\mu m$ , 250 x 10,5 mm) reliée à une pompe Merck-Hitachi L7100, un détecteur à barrette de diode Merck-Hitachi L7455 et une interface Merck-Hitachi D7000. Les nucléotides sont purifiés par chromatographie dans une solution 20 mM d'ATEA utilisée en isocratique à 3 mL/min. La détection du produit se fait à une longueur d'onde de 262 nm.

### VI.3 La filtration sur gel

La filtration sur gel est une chromatographie qui permet de séparer des molécules selon leur poids moléculaire et leur rayon hydrodynamique. Les molécules passent à travers une colonne remplie de billes poreuses. Les petites molécules pénétreront dans les pores alors que les plus grosses passeront entre les billes. Ainsi les petites molécules auront parcouru un plus long trajet dans la colonne et donc sortiront après les plus grosses molécules. Les pores ont des tailles différentes d'une résine à l'autre selon les molécules à séparer. Ainsi différentes résines ont été utilisées afin de dessaler les produits. Les sels étant de plus petite masse, ils sortent après les produits à séparer (de plus grosse masse).

### VI.4 Chromatographie d'affinité NiNTA

Les MUC1<sub>8</sub> glycosylés ont été purifiés sur NiNTA (Nickel Nitriloacétate). En effet les MUC possèdent une étiquette 6-His en N-ter qui leur permet d'être fixés sur NiNTA. Le milieu réactionnel est ajusté en NaCl (250 mM), imidazole (5 mM) en tampon phosphate (50 mM, pH 8). Après avoir rincé la résine avec ce tampon, le milieu réactionnel est mis en contact avec la résine pendant 2 h à 4°C. L'imidazole et le sel empêchent la fixation non spécifique. Après fixation, le gel est placé dans une colonne, rincé avec le tampon d'équilibration puis avec 1 volume de colonne d'imidazole 10 mM dans le tampon 5 mM phosphate pH 8, 250 mM NaCl et 1 volume d'imidazole 15 mM dans le même tampon. L'élution du produit se fait avec une solution d'imidazole (250 mM, pH 7,0). Les différentes fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE 10 %.

### VI.5 Gels SDS-PAGE

L'analyse des protéines est réalisée par gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La méthode de l'électrophorèse est basée sur le déplacement d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Le SDS permet d'assurer une charge nette négative des protéines qui sont aussi dénaturées dans ce détergent. Du fait de leur poids moléculaire, les protéines auront des vitesses de migration différentes et elles vont donc se séparer les unes des autres.

La séparation des protéines se fait par un gel de séparation à différentes concentrations en acrylamide selon la taille de la protéine à analyser. Les échantillons peuvent au préalable être réduits en DTT 100 mM, 5 min à 95°C. Ils passent par un premier

gel de concentration (5 % en acrylamide) avant d'être séparés dans le gel de séparation. Après migration, le gel est fixé (acide acétique 10 % : isopropanol 25 %) et coloré au bleu de Coomassie (0,25 % dans la solution de fixation) puis décoloré dans ce même mélange acide acétique-isopropanol puis transféré en 10% acide acétique avant d'être séché.

### VI.6 Dot-Blot

Les échantillons sont déposés sur une membrane de nitrocellulose à raison de quelques  $\mu\text{l}$  par dépôt de façon à concentrer l'échantillon au maximum. Après séchage à l'air libre, la saturation de la membrane est réalisée par un tampon de blocage (SuperBlock Blocking Buffer, Pierce). Après rinçage dans du TBS, la membrane est incubée en présence de la lectine (VVA ou PNA biotinylées 2 mg/mL, 1/300 soit 6,7  $\mu\text{g/mL}$ ) en TBS métaux, tampon de blocage 10 %, 15 min à température ambiante. Après 3 rinçages en TBS 0,05 % Tween 20, la membrane est incubée avec la Streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (1/1000, Promega), 15 min à température ambiante. Après 3 rinçages en TBS 0,05 % Tween 20 et 2 rinçages en TBS, le substrat de la phosphatase alcaline (BCIP/NBT, Calbiochem) est ajouté.

## VII. Techniques de caractérisation des produits

### VII.1 Chromatographie sur couche mince

Les produits sont déposés sur une plaque d'aluminium recouverte de silice puis ils migrent le long de la plaque entraînés par un mélange de solvants. La vitesse de migration dépend de la polarité des produits ainsi que de la polarité du mélange de solvants. Après un rapide séchage de la plaque, les produits sont révélés par un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 85/10/5 ou une solution de ninhydrine 2 % dans l'acétone pour les amines (galactosamine). Un simple dépôt sur la plaque de silice suivi de la révélation peut également être utilisé pour repérer en sortie de colonne les fractions contenant le sucre.

### VII.2 RMN et Spectrométrie de masse

Les analyses de RMN ont été réalisées sur un appareil Bruker à 500 MHz équipé d'une sonde BBI et d'un gradient de champ (50 G/cm). Les analogues et les UDP-sucre sont repris dans D<sub>2</sub>O alors que les sucres peracétylés sont repris dans CDCl<sub>3</sub> (entre 1 et 5 mg dans 500 µL).

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, les petites molécules ont été analysées en électrospray sur un appareil triple quadripole API 300 (Applied Biosystems) en mode positif pour les sucres et en mode négatif pour les sucres-1P et les UDP-sucre. Les échantillons sont injectés par (dans) un tube capillaire à des concentrations comprises entre 1 µM et 1 mM en présence de solvant (ACN/eau 50/50 avec 0,1 % de TEA) à faible débit dans un champ électrique afin de former des gouttelettes chargées. Les espèces chargées pourront ainsi être séparées selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). En mode positif, les charges sont données par les protons alors qu'en mode négatif les charges sont obtenues par déprotonation. Il se forme également des adduits avec les ions présents en solution.

Les molécules de plus gros poids moléculaire (>800 Da) ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) sur un Autoflex I (Bruker Daltonics) équipé d'un laser N<sub>2</sub> émettant à 337 nm et opérant en mode réflectron positif pour les (STP)<sub>5</sub>AG et en mode linéaire positif pour les MUC1<sub>8</sub> and MUC1<sub>9</sub>. Les échantillons sont déposés en présence d'un excès de matrice qui absorbe à la longueur d'onde du laser. En s'évaporant, la matrice entraîne l'échantillon

## Matériels et méthodes

(désorption). Le tir laser permet d'ioniser les molécules de la matrice qui vont à leur tour ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont alors accélérés vers un tube de vol par l'application d'un courant à haute tension. Les molécules volent jusqu'au détecteur selon leur rapport  $m/z$ . Selon le temps de vol, la masse de l'échantillon est déterminée.

## ***Résultats et discussion***

## I. Synthèse enzymatique de glycoconjugués

### I.1 Caractérisation des analogues de la GalNAc vis-à-vis des enzymes du cycle enzymatique

Différents analogues ont été synthétisés par voie chimique. Après purification et caractérisation, ceux-ci ont été testés en tant que substrats des enzymes de la voie de « récupération » de la GalNAc. Ces enzymes sont une kinase (GK2) et une UDP-GalNAc-pyrophosphorylase et enfin une ppGalNAc transférase, la ppGalNAc T1. Il a ainsi été possible de préparer différents glycopeptides à partir de certains analogues.

#### I.1.1 Article

« Synthesis and evaluation of analogs of GalNAc as substrates for enzymes of the mammalian GalNAc salvage pathway. »

# Synthesis and evaluation of analogs of GalNAc as substrates for enzymes of the mammalian GalNAc salvage pathway

Sabrina Pouilly,<sup>a</sup> Vanessa Bourgeaux,<sup>a,b</sup> Friedrich Piller,<sup>a</sup> and Véronique Piller<sup>\*a</sup>

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

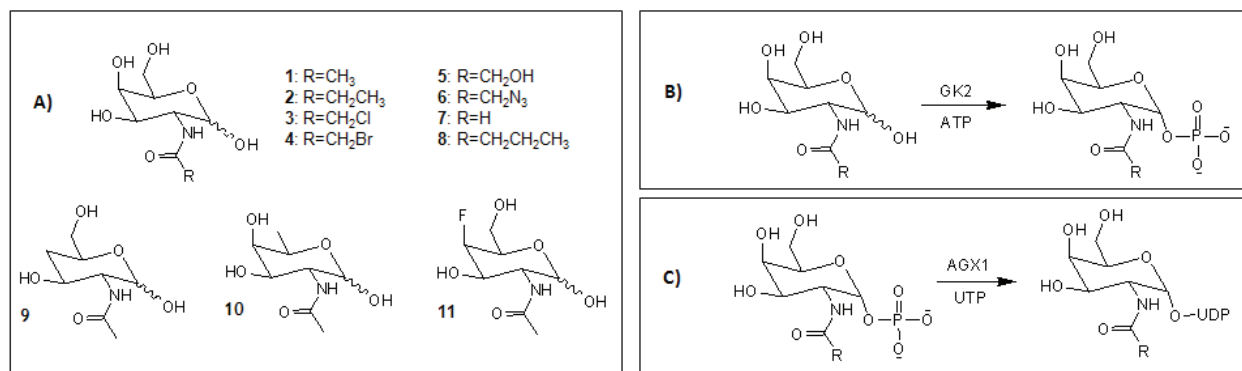
Changes in glycosylation are correlated to disease and associated with differentiation processes. Experimental tools are needed to investigate the physiological implications of these changes either by labeling of the modified glycans or by blocking their biosynthesis. N-acetylgalactosamine (GalNAc) is a monosaccharide widely encountered in glycolipids, proteoglycans and glycoproteins; once taken up by cells it can be converted through a salvage pathway to UDP-GalNAc which is further used by glycosyltransferases to build glycans. In order to find new reporter molecule able to integrate cellular glycans, synthetic analogs of GalNAc were prepared and tested as substrates of both enzymes involved in the GalNAc salvage pathway: the galactokinase 2 (GK2) and the uridylylpyrophosphorylase AGX1. Our in vitro analysis shows that several analogs are readily accepted by GK2 and AGX1 and some are incorporated into peptides by the polypeptide GalNAc transferase T1. The hexosamine analogs studied here will help to better define the structural requirements of the donor substrates for the enzymes involved in GalNAc metabolism. Besides, some of them may be incorporated into glycans of living cells and prove valuable tools for diagnostic and therapeutic use.

## Introduction

Carbohydrates contribute to life in many ways through their functions in energy metabolism and storage, and as components of the genetic material as well as of structural elements. Carbohydrates attached to proteins or lipids (glycans) play important roles in cellular communication during cell differentiation and development. Glycans are assembled from monosaccharides which can all be synthesized from glucose. In addition to a principal metabolic pathway, salvage pathways exist for most monosaccharides, which allow their incorporation directly from dietary sources into the biosynthetic routes of cellular glycan synthesis. Therefore, the addition to cells of labeled monosaccharides results in their incorporation into glycoproteins, glycolipids and proteoglycans. Using sialic acid analogs, it was discovered that enzymes intervening in the salvage pathway for sialic acid are rather permissive since they allow the integration of that monosaccharide modified with rather bulky groups into cellular glycoconjugates.<sup>1</sup> This observation was further extended to the precursor of sialic acid, N-acetylmannosamine (ManNAc).<sup>2</sup> Hexosamine (N-acetylgalactosamine (GalNAc) N-acetylglucosamine (GlcNAc) and ManNAc) analogs and sialic acid analogs were thus used to explore biological recognition events and downstream cellular behaviours<sup>3-4</sup> and have been introduced with great success into cells<sup>5,6</sup> as well as into living organisms<sup>7-8</sup> to probe either O- or N-glycans. For those purposes, azido analogs of hexosamines (GalNAz, GlcNAz, ManNAz) were incorporated through salvage pathways into glycans, expressed at the cell surface and then labeled by different techniques.<sup>9-10</sup> Other applications of hexosamine

analogs have been described<sup>11-12</sup> showing that fluoro derivatives on the C4 position of GalNAc (4FGalNAc) or GlcNAc (4FGlcNAc) could be used to modify cellular recognition events since their incorporation into cells changed the glycan content of P-selectin glycoprotein ligand-1, reducing leukocyte adhesion via selectins. Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines have also led to the concept of introducing sugar analogs into tumor-associated carbohydrate antigen in order to improve the immunogenicity of those antigens.<sup>13</sup>

If some hexosamine analogs have been already developed for metabolic labeling and chemical tagging, questions still arise with respect to competition with endogenous substrates and physiological consequences associated with the modifications introduced by the analogs. New hexosamines, and in particular GalNAc analogs, may present interesting properties for the possible inhibition of signaling pathways or the stimulation of cellular responses, particularly in the context of immunity and cancer. As incorporation of such analogs into cells is an important challenge for metabolic glycoengineering, we want to investigate which GalNAc analogs can be metabolized by cells. To be incorporated into cellular glycans, those analogs must first go through the biosynthetic steps of the GalNAc salvage pathway,<sup>14</sup> resulting in their conversion to the nucleotide sugar uridine diphosphatidyl GalNAc analogs (UDP-GalNAc analogs) which then serve as substrates for the GalNAc transferases acting downstream and allowing their incorporation into glycoproteins as well as proteoglycans and glycolipids. We thus analyzed in vitro which modifications of GalNAc could be accepted by the enzymes of the salvage pathway. This involves the phosphorylation on the C1 position of the analogs by galactokinase 2 and the use of the GalNAc analogs-1P as



**Scheme 1** Panel A) Synthetic analogs of *N*-Acetyl-galactosamine (GalNAc, **1**): GalNPr (**2**), GalNClAc (**3**), GalNBrAc (**4**), GalNGlycolyl (**5**), GalNAz (**6**), GalNFormyl (**7**), GalNBu (**8**), 4-DeoxyGalNAc (**9**), 6-DeoxyGalNAc (**10**) and 4-Deoxy-4-FluoroGalNAc (**11**). Panel B) Synthesis of [GalNAc or analog]-1P. Panel C) Synthesis of UDP-[GalNAc or analog].

substrates of the uridylylpyrophosphorylase AGX1 which produces the UDP-GalNAc analogs. Moreover, since for some purpose it is an advantage to by-pass the GalNAc salvage pathway by using UDP-GalNAc analogs either for direct injection into cells to label mucin type *O*-glycans<sup>8</sup> or for synthesizing oligosaccharides or glycopeptides enzymatically,<sup>15</sup> we employed our previously described two step enzymatic system<sup>16</sup> in order to obtain substantial amounts of UDP-GalNAc analogs. We also investigated whether those analogs could be attached in vitro to peptides or proteins by a polypeptide GalNAc transferase (ppGaNT) which transfers GalNAc from UDP-GalNAc to Ser and Thr residues of proteins. Our in vitro analysis shows that several analogs are readily accepted by the enzymes of the salvage pathway and further incorporated into peptides. They may thus be incorporated into glycans of living cells.

## Results and Discussion

### Synthesis of GalNAc analogs

To determine the substrate tolerance of the GalNAc salvage pathway enzymes, we used a series of GalNAc analogs whose structures are given in Scheme 1A. Compounds **2** to **8** were prepared from galactosamine hydrochloride. *N*-propionyl (**2**), *N*-chloroacetyl (**3**), *N*-bromoacetyl (**4**) derivatives were obtained in good yield (70% to 80%) after treatment of galactosamine in a mixture of methanol/ sodium methoxide with different acid anhydrides while the *N*-glycolyl compound (**5**) was obtained in lower amount (50% yield) after reaction of galactosamine with acetoxyacetylchloride. The azido derivative (**6**) was synthesized according to<sup>5</sup> and obtained in high yield (88%). On the other hand *N*-formyl galactosamine (**7**) was easily prepared, although with a 40% efficiency, through reaction between the amine and formic acid. *N*-butyryl galactosamine (**8**) was recovered in a 50% yield after reaction of the amine with the NHS-butyrate ester. The two deoxy derivatives (**9**) and (**10**) were obtained after efficient deprotection of di-*O*-pivaloyl GalNAc derivatives prepared as previously described<sup>17</sup> while the 4-deoxy-4-fluoroGalNAc (**11**) was obtained from Dr Szarek.<sup>18</sup>

### Relative specificity of the different analogs towards GalNAc kinase 2 (GK2) and UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1)

Since we wanted to explore the ability of those GalNAc analogs to be metabolized inside the cell through the salvage pathway, we first tested them as potential substrates of the human GalNAc kinase 2 (GK2, Scheme 1B) and of the human UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1, Scheme 1C). For that purpose we used recombinant forms of the enzymes prepared as previously described<sup>16</sup> and ATP as phosphate donor for GK2 while UTP served as nucleotide donor for AGX1. Not all the analogs tested were substrates of the enzymes, but for those which were substrates, Michaelis-Menten parameters were determined. The results are summarized in Table 1 (GK2) and Table 2 (AGX1).

Most of the GalNAc analogs tested can be phosphorylated by the recombinant human GK2. The *K<sub>m</sub>* value obtained for the natural compound, GalNAc (240 μM), is in very good agreement with those previously reported for the purified (140 μM<sup>19</sup>) as well as for the recombinant (220 μM<sup>16</sup>) GK2. *N*-azidoacetyl (**6**) and *N*-chloroacetyl (**3**) derivatives show a similar affinity for the enzyme (*K<sub>m</sub>* values 1.3 to 2 times higher than for GalNAc) and in the case of **6**, in the same order of magnitude than that previously obtained (500 μM<sup>16</sup>). On the other hand, for *N*-propionyl (**2**), *N*-bromoacetyl (**4**), *N*-glycolyl (**5**) and *N*-butyryl (**8**) derivatives, elongating the chain at the C2 position seems to highly reduce the affinity of the enzyme (*K<sub>m</sub>* values from 15 to 30 times higher than for GalNAc) while for a shorter chain (*N*-formyl, **7**) the *K<sub>m</sub>* value is intermediate between that of **3** and **6** and of **2**, **4**, **5** and **8**. Considering the X-ray crystallography data for GK2,<sup>20</sup> the pocket formed by the aminoacids of the active site, in the proximity of the *N*-acetyl group of the co-crystallized GalNAc, is rather wide. It is thus not surprising that other substrates carrying longer or modified chains on the amino group of the sugar can be accommodated although it is not clear why the *K<sub>m</sub>* values vary to such an extent between the different compounds tested. On the other hand, modifications of the OH at position 4 of the sugar ring seems to be rather permissive since both 4-deoxy (**9**) and 4-deoxy-4-fluoro (**11**) derivatives are recognized by GK2 with a relatively good

**Table 1** Kinetic parameters of GalNAc (**1**) and analogs (**2-11**) towards recombinant GK2.  $K_m$  and  $k_{cat}$  values were determined from Lineweaver-Burk plots obtained at different concentrations of each analog in the presence of saturating amount of [ $^{32}$ P] ATP during 20 to 60 min of incubation.

| Sugar     | GalNH <sub>2</sub> substitution   | $K_m$ (mM)  | $k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}K_m^{-1}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}K_m^{-1}$ (%) |
|-----------|-----------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>1</b>  | <i>N</i> -Acetyl                  | 0.24 ± 0.03 | 2.7 ± 1.1                    | 11.25                                                 | 100                   |
| <b>2</b>  | <i>N</i> -Propionyl               | 6.47 ± 0.15 | 2.3 ± 0.17                   | 0.35                                                  | 3.1                   |
| <b>3</b>  | <i>N</i> -Chloroacetyl            | 0.49 ± 0.07 | 0.15 ± 0.04                  | 0.31                                                  | 2.8                   |
| <b>4</b>  | <i>N</i> -Bromoacetyl             | 3.75 ± 0.21 | 7.6 ± 0.7                    | 2.03                                                  | 18.0                  |
| <b>5</b>  | <i>N</i> -Glycolyl                | 3.54 ± 0.51 | 10.13 ± 3.7                  | 2.86                                                  | 25.4                  |
| <b>6</b>  | <i>N</i> -Azidoacetyl             | 0.32 ± 0.01 | 0.57 ± 0.4                   | 1.78                                                  | 13.0                  |
| <b>7</b>  | <i>N</i> -Formyl                  | 1.08 ± 0.14 | 3.01 ± 0.5                   | 2.79                                                  | 24.8                  |
| <b>8</b>  | <i>N</i> -Butyryl                 | 4.70 ± 0.5  | 0.26 ± 0.04                  | 0.05                                                  | 0.4                   |
| <b>9</b>  | 4-Deoxy <i>N</i> -Acetyl          | 1.88 ± 0.39 | 1.26 ± 0.05                  | 0.67                                                  | 5.9                   |
| <b>10</b> | 6-Deoxy <i>N</i> -Acetyl          | > 10        | < 0.01                       |                                                       |                       |
| <b>11</b> | 4-Deoxy-4-fluoro <i>N</i> -Acetyl | 1.10 ± 0.02 | 1.85 ± 0.8                   | 1.68                                                  | 14.9                  |

affinity ( $K_m \sim 5$  times higher than for GalNAc) even if in the crystal, there is one interaction of the OH on C4 with an Asp of the active site. Finally, only the 6-deoxy derivative (**10**) is not at all a substrate for GK2. This could be related to the implication of the 6-hydroxyl group of GalNAc in two interactions with a His and a Glu residues of the GK2 active site as seen in the crystal structure.<sup>20</sup> Moreover, it was already shown that an azido group on the C6 of GalNAc (6AzGalNAc) prevents the incorporation of that analog into cell glycoconjugates,<sup>5</sup> suggesting that 6AzGalNAc is not an effective substrate of the GalNAc salvage pathway. Our results indicate that such inefficient incorporation could stem from GK2 essential recognition of the 6-hydroxyl group of GalNAc. Moreover, it should be noted that the specificity shown by GK2 is close to that observed for the bacterial *N*-acetylhexosamine 1-kinase which presents similar  $K_m$  and  $k_{cat}$  constants for GalNAc.<sup>21</sup> Besides, NahK also accepts 2- and 4-modifications of GalNAc and displays a more limited tolerance for a C6 substitution<sup>22</sup> since 6-azido- and 6-deoxy-GalNAc were transformed by NahK with significantly reduced yields.

If we now consider the catalytic efficiency  $k_{cat} K_m^{-1}$ , compounds **4**, **5**, **6**, **7** and **11** are transformed by GK2 to analogs-1P with rather good efficiency since they all present values between 13% and 25% of that obtained for the natural substrate GalNAc. In fact it corresponds to what was observed in the next step, when sugars-1P were prepared from the different analogs (see Experimental) in order to determine the

kinetic parameters of AGX1. After purification, analogs-1P synthesized by GK2 were recovered in yields ranging from 57% for GalNAc (**1**) to 10% for GalNButyryl (**8**) (Table 3). However, compound **10-P** was not synthesized by GK2 and compound **8-P** was obtained only in low amounts and could not be used in the determination of kinetic constants of AGX1.

**Table 2** Kinetic parameters of GalNAc-1P (**1-P**) and analogs-1P (**2-P** to **11-P**) towards recombinant AGX1.  $K_m$  and  $k_{cat}$  values were determined from Lineweaver-Burk plots obtained at different concentrations of each analog-1P in the presence of saturating amount of [ $^{3}$ H] UTP and during 20 to 60 min incubation.

| Sugar -1P   | GalNH <sub>2</sub> substitution   | $K_m$ (mM)        | $k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}K_m^{-1}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}K_m^{-1}$ (%) |
|-------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>1-P</b>  | <i>N</i> -Acetyl                  | 1.17 ± 0.12       | 1.81 ± 0.46                  | 1.55                                                  | 100                   |
| <b>2-P</b>  | <i>N</i> -Propionyl               | 9.25 ± 0.85       | 1.42 ± 0.5                   | 0.15                                                  | 9.7                   |
| <b>3-P</b>  | <i>N</i> -Chloroacetyl            | 5.08 ± 0.16       | 1.95 ± 0.05                  | 0.38                                                  | 24.5                  |
| <b>4-P</b>  | <i>N</i> -Bromoacetyl             | 7.26 ± 1.00       | 0.55 ± 0.23                  | 0.08                                                  | 5.2                   |
| <b>5-P</b>  | <i>N</i> -Glycolyl                | 0.57 ± 0.12       | 0.14 ± 0.09                  | 0.25                                                  | 16.1                  |
| <b>6-P</b>  | <i>N</i> -Azidoacetyl             | 2.57 ± 0.15       | 0.44 ± 0.02                  | 0.17                                                  | 11.0                  |
| <b>7-P</b>  | <i>N</i> -Formyl                  | 2.32 ± 0.57       | 0.28                         | 0.12                                                  | 7.74                  |
| <b>8-P</b>  | <i>N</i> -Butyryl                 | > 50              | < 0.01                       |                                                       |                       |
| <b>9-P</b>  | 4-Deoxy <i>N</i> -Acetyl          | 3.21 ± 0.12       | 1.12                         | 0.35                                                  | 22.6                  |
| <b>10-P</b> | 6-Deoxy <i>N</i> -Acetyl          | n.d. <sup>a</sup> | n.d.                         |                                                       |                       |
| <b>11-P</b> | 4-Deoxy-4-fluoro <i>N</i> -Acetyl | 1.99 ± 0.24       | 0.47                         | 0.24                                                  | 15.5                  |

<sup>a</sup> not determined

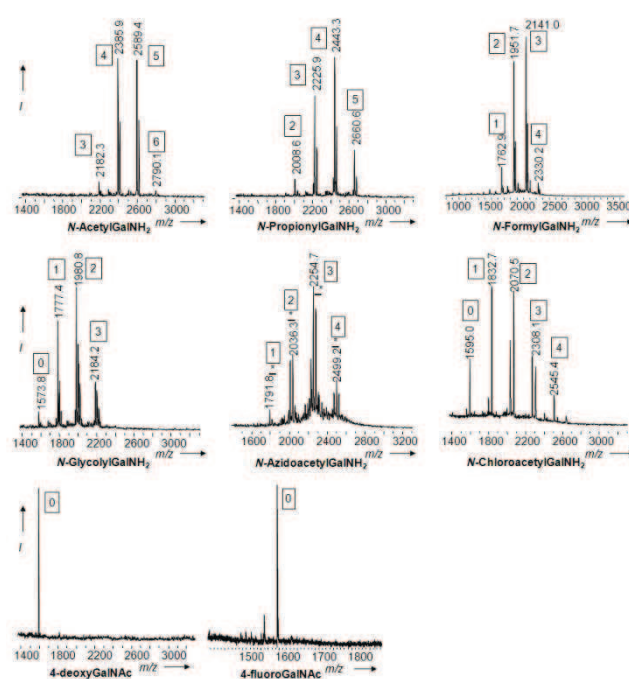
Concerning the formation of UDP-analogs from the analogs-1P by AGX1, the  $K_m$  value obtained in this study for the natural substrate GalNAc-1P (1.17 mM) was similar to that previously reported (0.67 mM<sup>16</sup> and 0.5 mM<sup>23</sup>). Analogs-1P **2-P** to **7-P**, **9-P** and **11-P** were recognized by the pyrophosphorylase, although with different affinities. GalNGlycolyl-1P (**5-P**) showed a  $K_m$  value near that of GalNAc-1P, the 4-deoxy-4-fluoro **11-P**, the *N*-azidoacetyl **6-P** and the *N*-formyl **7-P** derivatives presented a  $K_m$  about 2 times higher while for **2-P**, **3-P**, **4-P** and **9-P** the  $K_m$  values were 3 to 8 times higher than for GalNAc-1P. This shows that the recombinant form of AGX1 used in our study is able to interact with substrates modified on the *N*-acyl or on the C4 of the GalNAc moiety, in accordance with data obtained from the crystal structure of AGX1<sup>23</sup> where UDP-GalNAc was bound in the active site. The C4 hydroxyl group of the sugar moiety was found to interact with the enzyme in equatorial as well as in axial conformations, indicating the wideness of the

binding pocket around this position. On the other hand, the *N*-acetyl arm of GalNAc was found in the crystal to establish extensive contacts with the enzyme suggesting a rather specific recognition for this part of the substrate. Our results indicate that the binding site of AGX1 can lodge shorter as well as longer chains on this arm. However, among the analogs tested only **2-P**, **3-P** and **9-P** have a  $k_{cat}$  comparable to that of the natural substrate, all the others showing values 3 to 13 times lower than GalNAc-1P. As compared to the pyrophosphorylase GlnU, a GlcNAc-1-P uridylyltransferase from *E. coli* recently employed<sup>24-25</sup> to prepare UDP-GalNAc analogs, AGX1 shows the same tolerance for the 4-deoxy and the 4-deoxy-4-fluoro analogs but interestingly and contrary to GlnU, it can accept modifications on the *N*-acyl arm.

In terms of catalytic efficiency and according to the calculated value  $k_{cat}/K_m$ , besides the natural substrate **1-P**, compounds **3-P**, **5-P**, **6-P**, **9-P** and **11-P** are readily transformed by AGX1. This was effectively tested using GK2 in combination with AGX1 since in vivo both enzymes act in sequence, the product of the former being the substrate of the later. For that purpose, the different sugars were incubated overnight at 37°C with GK2 and AGX1 in the presence of ATP and UTP. Products were prepared on the mg scale and submitted to extensive purification (ion exchange plus reverse phase chromatography and gel filtration, see experimental) before quantification (Table 4). As already seen from our previous analysis with each enzyme separately, neither **8** nor **10** could be used by GK2 and AGX1 together. On the other hand, if AGX1 presented a rather good catalytic efficiency for **1-P**, **3-P**, **5-P**, **9-P** and **11-P**, when employed together with GK2, only **UDP-1** and **UDP-9** were produced in good amounts probably because of the high  $K_m$  of GK2 for **5** and its low  $k_{cat}$  for **3**. However and as expected, the best efficiency was obtained for GalNAc (43%) but compounds **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9** and **11** could be transformed into the corresponding UDP-analogs in mg amounts and allowed us to test them as substrates for one of the next steps encountered in vivo for GalNAc: the transfer to an acceptor peptide

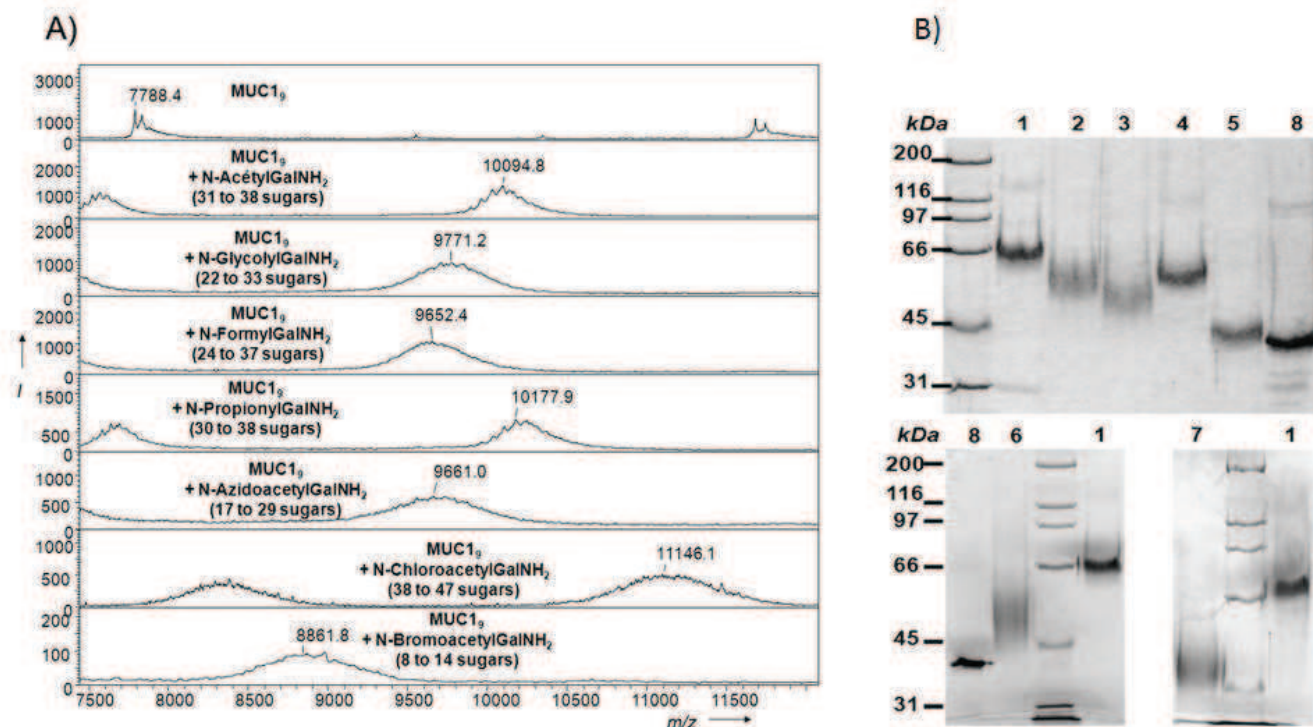
#### Transfer of UDP-analogs to peptides by a polypeptide $\alpha$ GalNAc transferase

UDP-GalNAc formed in the cell is used by GalNAc transferases in order to build glycans. In a first approach we verified if our analogs could be substrates in vitro of the UDP-GalNAc:polypeptide  $\alpha$ GalNAc transferase T1 (ppGaNT1), an ubiquitous polypeptide  $\alpha$ GalNAc transferase present in most tissues.<sup>26</sup> For that purpose we used the purified recombinant bovine enzyme<sup>27</sup> and UDP-analogs previously synthesized by the cooperative action of recombinant GK2 and AGX1. The acceptor substrates used were either a chemically synthesized peptide (STP<sub>5</sub>) consisting of 5 repeated STP units or a recombinant protein (MUC1<sub>9</sub>) produced and purified from *E. coli* and presenting 9 consecutive MUC1 tandem repeated motifs. After incubation at 37°C in the presence of the different donor substrates, we obtained highly glycosylated peptides and proteins which were characterized by mass spectrometry (Fig. 1 and 2A).



**Fig. 1** Mass spectra (MALDI-TOF) of STP<sub>5</sub> glycosylated by the GalNAc transferase ppGaNT1 starting from UDP-analogs. Above each peak is indicated, in a rectangle, the number of sugars incorporated onto the peptide. \* A difference of 24 Dalton is observed between the calculated and observed masses of STP<sub>5</sub>-GalNAz which corresponds to the substitution of the N<sub>3</sub> group by a NH<sub>2</sub>, due to a cleavage during mass spectrometry analysis.

UDP-4-deoxyGalNAc and UDP-4-deoxy-4-fluoroGalNAc are not substrates of the ppGaNT1 showing that the OH in position 4 of the sugar moiety is very important for this GalNAc transferase. Although it was already shown in a previous study<sup>28</sup> it is however in contrast to the results reported in<sup>11</sup> where an incorporation of the 4-deoxy-4-fluoroGalNAc was observed into cellular glycoproteins, including PSGL-1. This could be due to a transfer by another member of the ppGaNT family showing a lower specificity for the donor sugar than the T1 enzyme, although no data are yet available on that point. On the other hand, and as already demonstrated for GalNAz,<sup>29</sup> ppGaNT1 tolerates modifications on the GalNAc amido group and gives good glycosylation ratios with all the corresponding UDP-analogs. According to the few available data on the UDP-GalNAc binding site in ppGaNTs, it was observed in ppGaNT10 crystals that the Glu residue 345 of the WGGE motif interacted with the oxygen on the C4 of the GalNAc moiety.<sup>30</sup> This WGGE motif is present in all ppGaNTs<sup>31</sup> and was found in the region of the active site in the crystal structure of ppGaNT1, although this particular enzyme was not crystallized in the presence of either UDP-GalNAc or GalNAc.<sup>32</sup> On the other hand a mutation in Q in the ppGaNT1 of E 316, the equivalent of E345 in the ppGaNT10, reduced dramatically the enzymatic activity.<sup>33</sup> For the *N*-acetyl group of the GalNAc unit, it was found in the T10 crystallized enzyme in the proximity of a His residue (H 370) and of a Gly (G 320) which again are both situated in sequences conserved among



**Fig. 2** Panel A) Mass spectra (MALDI-TOF) of MUC1<sub>9</sub> glycosylated by the GalNAc transferase ppGaNT1 starting from UDP-analogs, with a representation of the  $[M+3H]^{3+}$  ions; the extent of transferred sugars for each analog is indicated on each spectrum. Panel B) Coomassie-stained gels after SDS-PAGE of glycosylated MUC1<sub>9</sub> is shown with *N*-acetyl (1), *N*-glycolyl (2), *N*-formyl (3), *N*-propionyl (4), *N*-azidoacetyl (5), *N*-chloroacetyl (6), *N*-bromoacetyl (7) galactosamine derivatives and non-glycosylated MUC1<sub>9</sub> (8).

all ppGanTs. However, when H 341 in ppGaNT1, which is the equivalent of H 370 in ppGaNT10, was mutated in either A, L, V, K or R, it had little effect on enzymatic activity.<sup>33</sup> In agreement with these results the present data show that ppGalNAcT1 can accommodate UDP-analogs carrying modified *N*-acyl groups on the amido function.

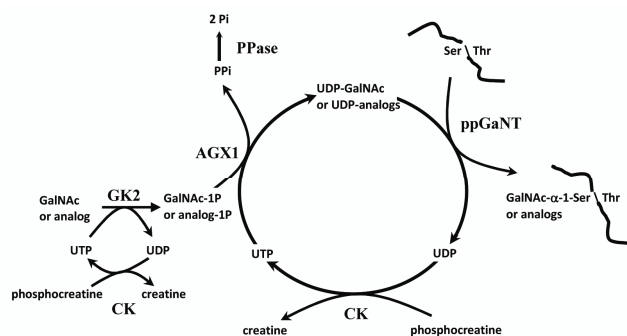
From the two acceptor substrates used in our study, slightly different results were obtained (compare the spectra in Fig. 1 and 2A). STP<sub>5</sub> was predominantly substituted on 4 or 5 Ser/Thr when GalNAc was used, it was mainly substituted on 4 residues for propionyl, 3 for the azido, 2 or 3 for the formyl and it dropped to 1 or 2 for the glycolyl and chloroacetyl derivatives. In the case of MUC1<sub>9</sub>, the chloroacetyl derivative gave the best yield of incorporation (42 units per peptide as a mean), GalNAc and propionyl gave the same ratio of substitution (around 35 units per peptide) while glycolyl and formyl were slightly less incorporated (about 28 analogs per peptide) followed by the azido derivative (23 units per peptide) and finally the bromo derivative with only 11 units transferred to each molecule of MUC1<sub>9</sub>. SDS-PAGE (Fig. 2B) carried out on MUC1<sub>9</sub> gives an illustration of the results obtained by MS. The naked peptide appears after Coomassie staining as a band with an apparent MW of 40 kDa. This protein migrates more slowly when glycosylated. However the distance of migration is not rigorously inversely proportional to the ratio of substitution by the different analogs. This may be due to a different adsorption of SDS depending of the quantity and type of analog present on the peptide.

Our results show that the GalNAc analogs **2**, **3**, **4**, **5**, **6** and **7** are substrates of the 3 enzymes GK2, AGX1 and ppGaNT1

and thus could, as it was already demonstrated for (**5**),<sup>5</sup> be incorporated in vivo in glycoproteins provided that they enter the cells. Besides, the chloroacetyl derivative is remarkably well incorporated in MUC<sub>9</sub> by the recombinant ppGaNT1 used in our study, since it occupies between 38 to 47 over the 59 Ser and Thr present in the total peptide sequence, which represents a mean of 72% of the free acceptor sites. It is thus a very good donor substrate for that glycosyltransferase, indeed better than GalNAc which is, under the same conditions, incorporated into 58% of the free Ser and Thr. Inversely, for the acceptor substrate STP<sub>5</sub>, GalNAc shows the best incorporation rate (45% of the free hydroxylated aminoacids) and the chloroacetyl derivative is significantly less transferred (15%). Although further investigations are needed in order to correctly interpret these discrepancies, it suggests that the incorporation of some sugar analogs may modify the structure of an acceptor protein.

### Transfer to peptides using an enzymatic cycle

As a crude model for an in vivo incorporation, we checked if those analogs which are individually substrates of GK2, AGX1 and ppGaNT1 could be used by the same enzymes engaged in a cycle roughly similar to what is found in the cells.<sup>34</sup> For that purpose the analogs were again incubated together with GK2, AGX1 and ppGaNT1 and two supplementary enzymes were added. First a yeast inorganic phosphatase (PPA) degrades the PPi formed during uridyl transfer by AGX1, thus preventing AGX1 to work in the reverse direction. Secondly, the rabbit creatine kinase (CP)



**Fig. 3** Enzymatic cycle used for the glycosylation of proteins.

recycles the UDP formed during GalNAc transfer onto the peptides by the ppGaNT1. This step is necessary to prevent inhibition of the transferase by accumulation of UDP as well as to furnish UTP necessary for GK2 and AGX1 activities (Fig. 3).

Two peptides: STP<sub>5</sub> (Fig. 4A) and MUC1<sub>8</sub> (Fig. 4B and 4C) were used as acceptors of the ppGaNT1 and GalNAc (**1**) as well as several analogs were tested: *N*-Propionyl(**2**)-, *N*-Chloroacetyl(**3**)-, *N*-Bromoacetyl(**4**)-, *N*-Glycolyl(**5**)-, *N*-Azidoacetyl(**6**)- and *N*-Formyl(**7**)-Galactosamine. Among them, and under the conditions tested, **1**, **5** and **7** were effectively transferred to the peptides. However, since we

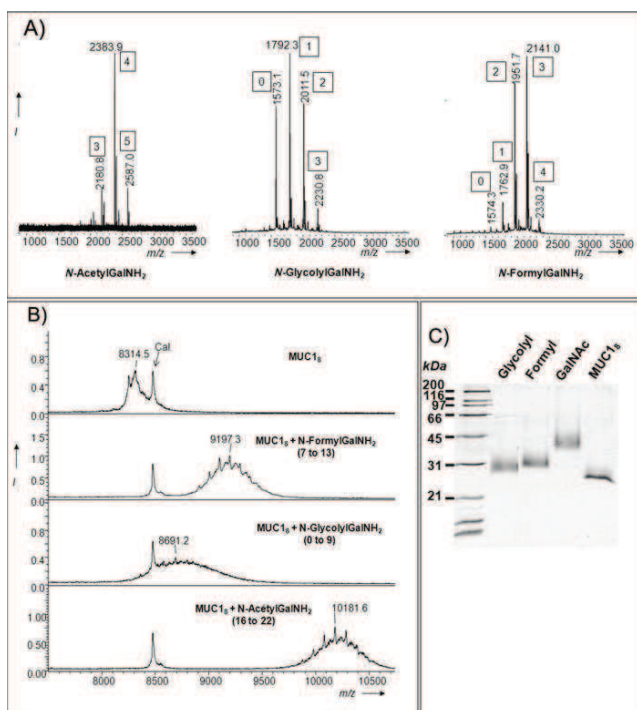
of the 3 enzymes GK2, AGX1 and ppGaNT1, we were surprised to note that they could not be used in the cycle. Moreover, GalNAz (**6**) has been successfully incorporated in different mammalian cells and tissues where it was shown to be a substrate for the GalNAc salvage pathway.<sup>5</sup> One possible explanation is that the concentration of the different analogs used in the cycle is not appropriate for all enzymes. We know for instance that the *K<sub>m</sub>* of GK2 for **2** and that of AGX1 for **2-P** are high and it is probable that the concentration of **2** (20 mM) used in this experiment is insufficient to compensate for the low efficiency of the two enzymes for that analog. More work is thus needed in order to improve the conditions employed in the glycosylation cycle. However they show that two peptides could be glycosylated with GalNAc analogs through an enzymatic cycle that mimics the in vivo pathway.

## Conclusions

The results gathered here show that besides GalNAz and 4FGalNAc, other analogs of GalNAc can be transformed in UDP-analogs through the GalNAc salvage pathway. The kinetic data presented in this study give some information on the substrate recognition of both enzymes GK2 and AGX1 which constitute the pathway. Moreover, six UDP-GalNAc analogs formed by GK2 and AGX1 could be transferred to peptides and again, the analogs tested in this work provide indications on the nucleotide sugar donor specificity of ppGaNT1. In addition, the tools developed here are quite adapted for the metabolic engineering of glycoproteins and for the production of substantial amounts (in the mg range) of glycopeptides bearing GalNAc analogs. Since five of the novel analogs presented here (*N*-propionyl, *N*-azidoacetyl, *N*-chloroacetyl, *N*-glycolyl and *N*-formyl galactosamine) are substrates of the three enzymes tested, we expect that these analogs will also be taken up by cells and incorporated into glycoconjugates as it was already demonstrated for GalNAz.<sup>5</sup> Work is in progress to test their incorporation into mammalian cells and their recognition by other glycosyltransferases involved in glycan biosynthesis.

## Experimental

**General.** All chemicals used were reagent or analytical grade. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck silica gel 60 F254 plates (0.25mm). Compounds were visualized by UV irradiation or dipping the plate in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O/ EtOH (5:10:85) solution followed by heating. Ninhydrine (2% in acetone) was also used to check for the presence of amine. Flash column chromatography was carried out using forced flow of the indicated solvent on Merck silica gel 40-70 μm (230-400 mesh). Ion exchange resins were from Sigma (Dowex Marathon MR-3, 20-50 Mesh) Bio-Rad (Dowex 50X8 AG, 100-200 mesh) and from Fluka (Dowex 1X8, 200-400 mesh). Gel filtration was performed on Bio-Gel P2 (<45 μm) from Bio-Rad. Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra were recorded on an Advance-Bruker spectrometer at 500 MHz. Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to the solvent and coupling constants (*J*) in Hz.



**Fig. 4** Mass spectra (MALDI-TOF) of A) STP<sub>5</sub> and B) MUC1<sub>8</sub> glycosylated via the enzymatic cycle, with a representation of the  $[M+2H]^{2+}$  ions; the number of units added for each analog is given for each product. C) Coomassie-stained gel after SDS-PAGE of glycosylated and non-glycosylated MUC1<sub>8</sub>.

have previously shown that the propionyl (**2**), the chloroacetyl (**3**) and the azidoacetyl (**6**) analogs are substrates

Small molecules were analyzed by ESI-Mass Spectrometry performed with a triple quadrupole API 300 (Applied Biosystems) in positive or negative mode for sugars and negative mode for sugar-1P and UDP-sugars. Proteins were analyzed by MALDI-TOF Mass Spectrometry performed with an Autoflex I (Bruker Daltonics) fitted with a 337 nm nitrogen laser and operating in reflector positive mode for the peptide STP<sub>5</sub> and in linear positive mode for small proteins. Scintillation counting was performed in a Packard TriCarb liquid scintillation counter. Procedures for preparation of the recombinant enzymes, human GalNAc Kinase 2 (GK2), human UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1) and bovine UDP-GalNAc:polypeptide  $\alpha$ GalNAc transferase 1 (ppGaNT1) necessary for the following steps have been already described.<sup>16</sup> The peptide STP<sub>5</sub> (sequence: STPSTPSTPSTPSTPAG) was chemically synthesized and provided by P. Marceau (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, France) whereas the MUC1<sub>8</sub> (sequence: MH<sub>6</sub>AS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)<sub>8</sub>MRM) and the MUC1<sub>9</sub> (sequence: MH<sub>6</sub>ARKKWKKAS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)<sub>9</sub>ALALGSTAPPVHNVTATSALGSTAPPVHNVTATSKKWKKP SMRM) recombinant proteins were produced in *E. coli*.<sup>35</sup>

**2-Propionylamido-2-deoxy-D-galactopyranose (GalNPr, 2).** The method was adapted from.<sup>36</sup> To galactosamine hydrochloride (Sigma, 100 mg, 0.464 mmol) in a solution of MeOH (4 mL) was added 1 eq of NaOMe (25 mg, 0.464 mmol). The solution was stirred for 30 min at rt. Propionic anhydride (4 eq, 239  $\mu$ L, 1.856 mmol) was then added and the solution was stirred overnight. The product was passed through Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>), desalted on Bio-Gel P-2 and lyophilized. The 2-Propionylamido-2-deoxy-D-galactopyranoside was obtained in a yield of 80% (87.6 mg). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\alpha$  and  $\beta$  anomers mixture:  $\delta$  5.23 (d,  $J$  = 3.5 Hz, H<sub>1a</sub>), 4.66 (d,  $J$  = 8 Hz, H<sub>1b</sub>), 4.16 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 4.13 (dd,  $J$  = 3 Hz, 6.75 Hz, 1H), 4.10 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 4.0 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3.94 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3.92 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3.77 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3.71 (dd,  $J$  = 4 Hz, 8 Hz, 1H), 2.32 (q,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>2a</sub>), 2.31 (q,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>2b</sub>), 2.13 (t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3a</sub>), 2.13 (t,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>3b</sub>). ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>,  $M$ =235.24; found: 236.2 [ $M$  + H]<sup>+</sup>, 258.4 [ $M$  + Na]<sup>+</sup>.

**2-Chloroacetamido-2-deoxy-galactopyranose (GalNClAc, 3).** To galactosamine hydrochloride (200 mg, 0.928 mmol) in MeOH (8 mL) was added 1 eq of NaOMe (50.1 mg, 0.928 mmol). The solution was stirred for 30 min at rt. Chloroacetic anhydride (1.5 eq, 180.97 mg, 1.392 mmol) and TEA (194  $\mu$ L, 1.392 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched by addition of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40  $\mu$ L) and the mixture concentrated to dryness. Remaining galactosamine was separated from *N*-chloroacetyl galactosamine by flash chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2. Eluted fractions containing the product were evaporated. The residue was dissolved in water and treated with Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>) to eliminate TEA. It was then desalted on Bio-Gel P-2 in water and lyophilized. The 2-

chloroacetamido-2-deoxy-D-galactopyranoside was obtained in a yield of 70% (166.1 mg). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\alpha$  and  $\beta$  anomers mixture:  $\delta$  5.26 (d,  $J$  = 4 Hz, H<sub>1a</sub>), 4.72 (d,  $J$  = 8.5 Hz, H<sub>1b</sub>), 4.21 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 4.20 (s, CH<sub>2a</sub>), 4.05 (s, CH<sub>2b</sub>), 4.18 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 4.12 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.99 (dd,  $J$  = 3 Hz, 15 Hz, 1H), 3.95 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 3.92 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 3.80 (dd,  $J$  = 3.5 Hz, 10.7 Hz, 1H), 3.75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3.71 (dd,  $J$  = 4.5 Hz, 7.5 Hz, 1H). ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>Cl,  $M$ =255.66; found: 273.5 and 275.5 [ $M$  + H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>.

## 2-Bromoacetamido-2-deoxy-D-galactopyranose

**(GalNBrAc, 4).** The product was synthesized and purified according to the same protocol used for 2-chloroacetamido-2-deoxy-D-galactopyranoside but starting from galactosamine hydrochloride and bromoacetic anhydride. The 2-bromoacetamido-2-deoxy-D-galactopyranoside was obtained in a yield of 70% (194.9 mg). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\alpha$  and  $\beta$  anomers mixture:  $\delta$  5.26 (d,  $J$  = 3.5 Hz, H<sub>1a</sub>), 4.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, H<sub>1b</sub>), 4.19 (s, CH<sub>2a</sub>), 4.08 (s, CH<sub>2b</sub>), 4.17 (t,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 4.14 (d,  $J$  = 5 Hz, 1H), 4.11 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.96 (dd,  $J$  = 1.5 Hz, 4.75 Hz, 1H), 3.81 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 3.79 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 3.77 (d,  $J$  = 6 Hz, 1H), 3.75 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3.70 (dd,  $J$  = 4.5 Hz, 6.75 Hz, 1H). ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>Br,  $M$ =300.11; found: 299 and 301 [ $M$  + H]<sup>+</sup>, 321 and 323 [ $M$  + Na]<sup>+</sup>.

## 2-Hydroxyacetamido-2-deoxy-D-galactopyranose

**(GalNGlycolyl, 5).** The method was adapted from.<sup>37</sup> To galactosamine hydrochloride (200 mg, 0.928 mmol) in MeOH (8 mL) was added 1 eq of NaOMe (50.1 mg, 0.928 mmol). The solution was stirred for 30 min at room temperature (rt). Acetoxyacetylchloride (1.5 eq, 150  $\mu$ L, 1.392 mmol) and triethylamine (TEA, 194  $\mu$ L, 1.392 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at rt. The reaction was quenched by addition of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40  $\mu$ L) and the mixture was concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2. Eluted fractions containing the product were evaporated to dryness. The residue was dissolved in MeOH (5 mL) and 0.1 eq NaOMe (5 mg, 0.093 mmol) was added. The solution was stirred for about 1 h while deacetylation was followed by TLC. The reaction mixture was passed through Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>) resin to eliminate TEA salts and the flow-through was evaporated. The residue was dissolved in water, desalted on Bio-Gel P-2 and lyophilized. The 2-Hydroxyacetamido-2-deoxy-D-galactopyranoside was obtained in a yield of 50% (110.0 mg) after purification and characterized by <sup>1</sup>H-NMR and mass spectrometry. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\alpha$  and  $\beta$  anomers mixture:  $\delta$  5.26 (d,  $J$  = 3.5 Hz, H<sub>1a</sub>), 4.74 (d,  $J$  = 8.5 Hz, H<sub>1b</sub>), 4.21 (dd,  $J$  = 3.5 Hz, 11 Hz, 1H), 4.17 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 4.15 (s, CH<sub>2a</sub>), 4.14 (s, CH<sub>2b</sub>), 4.11 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 4.01 (dd,  $J$  = 3 Hz, 14 Hz, 1H), 3.96 (dd,  $J$  = 3 Hz, 6.75 Hz, 1H), 3.83 (dd,  $J$  = 3.5 Hz, 11 Hz, 1H), 3.78 (d,  $J$  = 6 Hz, 1H), 3.76 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3.71 (dd,  $J$  = 4 Hz, 8.25 Hz, 1H). ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>7</sub>,  $M$ =237.21; found: 238 [ $M$  + H]<sup>+</sup>, 260 [ $M$  + Na]<sup>+</sup>.

### 2-Azidoacetamido-2-deoxy-D-galactopyranose (GalNAz, 6).

The product was synthesized according to.<sup>5</sup> Briefly GalNHCOCH<sub>2</sub>Cl, **3** (150 mg, 0.59 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (4 mL) followed by the addition of NaN<sub>3</sub> (226 mg, 3.48 mmol). After stirring at 50°C overnight, reaction mixture was co-evaporated with acetone leading to residual NaN<sub>3</sub> precipitation which was filtered off. The filtrate was concentrated to dryness and desalted on Bio-Gel P-2 in water. After lyophilization, 2-azidoacetamido-2-deoxy-D-galactopyranoside was characterized by NMR and mass spectrometry (88 %, 137 mg). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O), α and β anomers mixture: δ 5.18 (d, *J* = 3.5 Hz, H<sub>1α</sub>), 4.63 (d, *J* = 8 Hz, H<sub>1β</sub>), 4.12 (dd, *J* = 5 Hz, 6.5 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.01 (s, CH<sub>2</sub>, 4H), 3.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.87 (td, *J* = 3.9 Hz, 10.5 Hz, 1H), 3.74-3.66 (m, H<sub>6</sub>, 4H), 3.63 (dd, *J* = 3.9 Hz, 7.9 Hz, 1H). ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, *M*=262.22; found: 285.5 [*M* + Na]<sup>+</sup>.

### 2-Formylamido-2-deoxy-D-galactopyranose

(GalNFormyl, **7**). Galactosamine hydrochloride (100 mg, 0.466 mmol) was dissolved in formic acid and stirred at least 5 h at rt. The solution was evaporated and the residue was dissolved in water (1 mL). The mixture was treated by Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>) resin to eliminate galactosamine and desalted on Bio-Gel P-2. It was then treated by Dowex 1X8 (OH<sup>-</sup>) to eliminate formic acid and desalted on Bio-Gel P-2. Lyophilization afforded 2-formylamido-2-deoxy-D-galactopyranose in a 40% yield (38.6 mg). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O), α and β anomers mixture: δ 8.2 (d, *J* = 26 Hz, H<sub>αaldehyde</sub>), 8.0 (d, *J* = 12 Hz, H<sub>βaldehyde</sub>), 5.26 (d, *J* = 3.5 Hz, H<sub>1α</sub>), 4.70 (d, *J* = 8.5 Hz, H<sub>1β</sub>), 4.23 (dd, *J* = 3.5 Hz, 11 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.01 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 3 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 3.5 Hz, 11 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 5 Hz, 12.75 Hz, 1H), 3.76 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 3.71 (dd, *J* = 4.5 Hz, 7.75 Hz, 1H). ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub>, *M*=207.18; found: 208.1 [*M* + H]<sup>+</sup>, 230 [*M* + Na]<sup>+</sup>.

### 2-Butyramido-2-deoxy-D-galactopyranose (GalNBu, 8).

A solution of 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (450 mg, 2.18 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added drop wise to a cooled stirred solution of butyric acid (200 μL, 2.18 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (251 mg, 2.18 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). The mixture was stirred overnight at rt. After the reaction was judged complete by TLC analysis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1), the mixture was filtered off and the solution was dried *in vacuo* to give crude *N*-hydroxysuccinimidyl butyrate (400 mg). This material was used without further purification. Galactosamine hydrochloride (150 mg, 0.7 mmol) in water (1.5 mL) was activated by addition of NaHCO<sub>3</sub> (116 mg, 1.39 mmol) followed by addition of NHS-butyrate (185 mg, 1 mmol) in THF (2 mL). The reaction mixture was allowed to stir at rt overnight and product formation was checked by TLC. The reaction mixture was dried *in vacuo* to yield a yellow oil (500 mg). This crude material was dissolved in water and loaded on a Sep-Pack column (C18, 6 mL cartridge, Waters). Elution by water afforded, after drying, 55.4 mg of a yellowish sticky

solid. This solid was then dissolved in water and treated by mixed bed resin Dowex Marathon MR-3 (H<sup>+</sup> and OH<sup>-</sup> forms, 4 mL) to yield the desired product (**8**) in a white powdery mixture of anomers (50%, 23.6 mg), <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O), α and β anomers mixture: δ 5.25 (d, *J* = 3.75 Hz, H<sub>1α</sub>), 4.66 (d, *J* = 8.45 Hz, H<sub>1β</sub>), 4.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.13 (dd, *J* = 2.2 Hz, 4.1 Hz, 1H), 4.01 (d, *J* = 3.15 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 3.78 Hz, 1H), 3.91 (d, *J* = 3.45 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 4.73 Hz, 1H), 3.81-3.71 (m, CH<sub>6</sub>, 4H), 2.30 (t, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2α</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2β</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 2H), 1.64 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>, 6H). ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>, *M*=249.27; found: 247.5 [*M* - H]<sup>-</sup>, 497.1 [2*M* - H]<sup>-</sup>.

### 2-Acetamido-2,4-dideoxy-D-hexopyranose (4-DeoxyGalNAc, 9).

This analog was prepared starting from 2-acetamido-2,4-dideoxy-3,6-di-*O*-pivaloyl-α-D-xylo-benzyl hexopyranoside, according to<sup>17</sup> and provided by Pr O. Martin (Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, France). This compound was dissolved (0.25 g, 0.54 mmol) in 15 mL of a solution of sodium (0.04g, 1.7 mmol) in MeOH and stirred for 18 h at rt. After addition of H<sub>2</sub>O (2 mL), the mixture was concentrated to dryness and the residue dissolved in MeOH to yield a yellow oil of 2-acetamido-2,4-dideoxy-α-D-xylo-benzyl hexopyranoside (140 mg, 0.47 mmol.) This product was debenzoylated after dissolution in 75 mL isopropanol/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6:2) and addition of CH<sub>3</sub>COOH (5mL). After stirring under H<sub>2</sub> atmosphere for 72 h at rt, the suspension was filtered and the filtrate was concentrated and azeotroped twice with toluene and dried *in vacuo*. The residue was further purified from re-crystallization in pentane followed by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 1:1 → 0:1) affording 95 mg, 0.46 mmol (85 % yield from the protected form) of (**9**) as a mixture of anomers, <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD), α and β anomers mixture: δ 5.36 (d, *J* = 3.5 Hz, H<sub>1α</sub>), 4.74 (d, *J* = 8.5 Hz, H<sub>1β</sub>), 4.26-4.22 (m, 1H), 4.12 (td, *J* = 5 Hz, 11 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 7 Hz, 10.5 Hz, 1H), 3.83-3.62 (m, 4H), 2.17 (d, *J* = 1.5 Hz, CH<sub>3α</sub> and CH<sub>3β</sub>, 6H), 1.66-1.55 (m, H<sub>4a</sub> and H<sub>4b</sub>, 4H). ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>, *M*=205.21; found: 228.5 [*M* + Na]<sup>+</sup>.

### 2-Acetamido-2,6-dideoxy-D-galactopyranose (6-DeoxyGalNAc, 10).

This analog was prepared as described above but starting from 2-acetamido-2,6-dideoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl-α-D-benzyl galactopyranoside which has been synthesized according to<sup>17</sup> and supplied by Pr O. Martin. De-protection afforded 2-acetamido-2,4-dideoxy-3,6-di-*O*-pivaloyl-α-D-xylo-benzyl hexopyranoside with a 89% yield, as a mixture of anomers. After de-benzylation, (**10**) was obtained with a yield of 51%. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD), α and β anomers mixture: δ 5.06 (d, *J* = 2.2, H<sub>1α</sub>), 4.51 (d, *J* = 7.8, H<sub>1β</sub>), 4.20-3.20 (m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, 8H), 1.99 (s, NH-CO-CH<sub>3</sub>, 6H), 1.40-1.10 (m, CH-CH<sub>3</sub>, 6H). ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>, *M*=205.21; found: 206.0 [*M* + H]<sup>+</sup>.

### 2-Acetamido-2,4-dideoxy-4-fluoro-D-galactopyranose (4-Deoxy-4-fluoroGalNAc, 11).

This derivative was

synthesized according to<sup>18</sup> and was kindly donated by Dr W. Szarek (Queen's University, Kingston, Canada).

**Synthesis of sugars-1P.** Each analog was added at 3 to 20 mM final concentration (Table 3), depending on the analog, to a reaction mixture containing bovine serum albumin (BSA, 1 mg mL<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), ATP (3 mM) and GK2 (28 µg mL<sup>-1</sup>, 16 mU mL<sup>-1</sup>) in Tris/HCl (75 mM, pH 8.5). After incubation overnight at 37°C, the reaction was quenched by 10mL MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). After centrifugation, the solution was passed on a column of anion exchanger (Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>))

**Table 3.** Synthesis of sugars-1P

| Sugar | Sugar-1P               |                           |                                                                          |                    |
|-------|------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|       | C <sup>a</sup><br>(mM) | Yield <sup>b</sup><br>(%) | MS-ESI m/z                                                               |                    |
|       |                        |                           | calculated                                                               | Found<br>[M-H]     |
| 1     | 3                      | 57                        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>9</sub> P, M=301.19               | 300.2              |
| 2     | 10                     | 24                        | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>9</sub> P, M=315.22               | 314.3              |
| 3     | 10                     | 18                        | C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>9</sub> P,<br>M=335.64          | 334.0 and<br>336.1 |
| 4     | 20                     | 22                        | C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> BrNO <sub>9</sub> P,<br>M=380.09          | 377.4 and<br>379.4 |
| 5     | 10                     | 21                        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>10</sub> P, M=317.19              | 316.0              |
| 6     | 10                     | 24                        | C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P, M=342.20 | 341.0              |
| 7     | 10                     | 56                        | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>9</sub> P, M=287.16               | 286.2              |
| 8     | 20                     | 10                        | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>9</sub> P, M=329.24              | 328.0              |
| 9     | 10                     | 58                        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>8</sub> P, M=285.19               | 284.0              |
| 11    | 10                     | 28                        | C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> FNO <sub>8</sub> P,<br>M=303.18           | 301.9              |

<sup>a</sup>Concentration during enzymatic synthesis

<sup>b</sup>Yield obtained after purification

and washed by 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. The product was eluted by 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and desalted by gel filtration on Sephadex G-10 (GE Healthcare). They were analyzed by mass spectrometry.

**Synthesis of UDP-sugars.** Each analog was incubated overnight at 37°C at 4, 5, 10 or 15 mM depending on the analog (Table 4), in 25 µL Tris/HCl (75 mM, pH 8.5), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), UTP (2.8 mM), ATP (4 mM), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), GK2 (28 µg mL<sup>-1</sup>, 16 mU mL<sup>-1</sup>), AGX1, (9.4 µg mL<sup>-1</sup>, 35 mU mL<sup>-1</sup>) and yeast inorganic phosphatase (PPA, Sigma, 1.6 µg mL<sup>-1</sup>, 3 U mL<sup>-1</sup>). The reaction was stopped by addition of MeOH (1 vol.) and the mixture kept on ice for 1 h in order to precipitate the proteins. After centrifugation, the supernatant was adjusted to 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and loaded onto a 5 mL Hi-Trap QXL column (GE Healthcare). After washing with 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, elution was performed with a gradient of NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (400 mL of 50 to 250 mM, 3 mL min<sup>-1</sup>). UDP-GalNAc analogs were recovered in fractions eluting at approximately 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, desalted on Sephadex G-

10 and further separated from contaminating non reacted analogs by HPLC (Nucleosil 300 Å, 5µm, 250 x 10.5 mm) developed in 20 mM TEAA (3 mL min<sup>-1</sup>). Detection at 214nm and 262 nm allowed to recover fractions containing UDP-sugars which were desalted on Bio-Gel P-2 before analysis by mass spectrometry (Table 4).

**Table 4.** Synthesis of UDP-sugars

| Sugar | C <sup>a</sup><br>(mM) | Yield <sup>b</sup><br>(%) | UDP-sugars                                                                                    |                    |
|-------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|       |                        |                           | MS-ESI m/z                                                                                    |                    |
|       |                        |                           | calculated                                                                                    | Found<br>[M-H]     |
| 1     | 5                      | 43                        | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=607.36   | 607                |
| 2     | 15                     | 11                        | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=621.39   | 620.5              |
| 3     | 15                     | 22                        | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=641.81 | 640.1 and<br>642.2 |
| 4     | 15                     | 10                        | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=686.26 | 685.5 and<br>687.6 |
| 5     | 10                     | 16                        | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>18</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=623.36   | 622.5              |
| 6     | 10                     | 20                        | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=648.37   | 647.0              |
| 7     | 15                     | 16                        | C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=593.34   | 592.5              |
| 9     | 4                      | 37                        | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=591.36   | 590.3              |
| 11    | 4                      | 16                        | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub> ,<br>M=609.34  | 608.1              |

<sup>a</sup>Concentration during enzymatic synthesis

<sup>b</sup>Yield obtained after purification

**Michaelis constants determination.** Each analog or analog-1P was incubated for 20 to 60 min at 37°C in 25 µL Tris/HCl (75 mM, pH 8.5), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), and either [<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, 0.5 mM, 10<sup>4</sup> cpm nmol<sup>-1</sup>) with GK2 (4.2 µg mL<sup>-1</sup>, 2.4 mU mL<sup>-1</sup>) or [<sup>3</sup>H]UTP (Perkin Elmer, 4 mM, 600 cpm nmol<sup>-1</sup>) with AGX1 (3.8 µg mL<sup>-1</sup>, 14 mU mL<sup>-1</sup>) and PPA (1.6 µg mL<sup>-1</sup>, 3 U mL<sup>-1</sup>). Incubations were stopped by dilution with water and treated as above. Each experiment was repeated at least 3 times.

**Synthesis of glycopeptides starting from the UDP-GalNAc analogs.** Each UDP-GalNAc analog (2 mM) was incubated at 37°C in 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (50 mM, pH 6.5) containing dithiothreitol (2 mM), BSA (0.2 mg mL<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub> (15 mM), recombinant bovine polypeptide αGalNAc transferase 1, (ppGaNT1, 30 µg mL<sup>-1</sup>, 40 mU mL<sup>-1</sup>) and either STP<sub>5</sub> (0.4 mM) or MUC1<sub>9</sub> (0.06 mM). After 6 hours Calf Intestinal Phosphatase (CIP, New England Biolabs, 5.72 µg mL<sup>-1</sup>, 10000 U mL<sup>-1</sup>) was added, followed 1 h later by additional amounts of ppGaNT1 (9.23 µg mL<sup>-1</sup>) and UDP-GalNAc analog (2 mM). Incubation was pursued for 24 h and the reaction stopped by the addition of MeOH (1 vol.). The

mixtures were kept on ice for 1 h in order to precipitate the proteins. After centrifugation, the supernatants which contain the glycopeptides were dialyzed against water and analyzed by mass spectrometry and also by SDS-PAGE (8% acrylamide) in the case of MUC1<sub>9</sub>.

**Synthesis of glycopeptides using the enzymatic cycle.** The different analogs (5 mM for 1, 20 mM for 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9) were incubated overnight at 37°C in imidazole (75 mM, pH 7) containing GK2 (21 µg mL<sup>-1</sup>, 11 mU mL<sup>-1</sup>), AGX1 (1.6 µg mL<sup>-1</sup>, 6 mU mL<sup>-1</sup>), PPA (9.8 µg mL<sup>-1</sup>), rabbit muscle creatine kinase (Sigma 10.6 µg mL<sup>-1</sup>), ppGaNT1 (12 µg mL<sup>-1</sup>, 16 mU mL<sup>-1</sup>), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), glycerol (5% vol/vol), creatine phosphate (Sigma, 20 mM), UTP (0.2 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) and the peptide (10 or 60 mM for STP<sub>5</sub> or MUC1<sub>8</sub>, respectively). Glycopeptides were then submitted to dialysis against water (for STP<sub>5</sub>) or NiNTA affinity chromatography (for MUC1<sub>8</sub>) and desalted over Bio-Gel P-2. They were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and also by SDS-PAGE (12% acrylamide) for MUC1<sub>8</sub>.

## Acknowledgements

We thank Nicole Bureaud and Philippe Marceau (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans) for the preparation of MUC recombinant proteins, and the synthesis of the STP<sub>5</sub> peptide, respectively. Thanks are also due to Pr. Olivier Martin, Dr. Mathieu Laurent and Sophie Front-Deschamps (Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans) who provided us with the 2-acetamido-2,6-dideoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-benzyl galactopyranoside and the 2-acetamido-2,4-dideoxy-3,6-di-pivaloyl- $\alpha$ -D-xylo-benzyl hexopyranoside and to Dr Walter Szarek (Queen's University, Kingston, Canada) for the generous gift of 2-acetamido-2,4-dideoxy-4-fluoro-D-galactopyranose. We are grateful to Hervé Meudal (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans) who performed the NMR analysis, Guillaume Gabant and Dr Martine Cadène (Mass Spectrometry Facility, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans) for their expert help with the MALDI-TOF analysis and Laëtitia Fougère (Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans) who performed the ESI-Mass Spectrometry analysis. This work received supports from the CNRS and the Région Centre (fellowships to SP and VB) and from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

## Notes and references

<sup>a</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Université d'Orléans & INSERM, Rue Charles Sadron, F45071 Orléans Cedex 2, France, Fax: (+33) 238255540; Tel: (+33)238257643; E-mail: [veronique.piller@cnrs-orleans.fr](mailto:veronique.piller@cnrs-orleans.fr)  
<sup>b</sup> present address: ERYtech Pharma, Bâtiment Adénine, 60 Avenue Rockefeller, F69008 Lyon, France  
<sup>†</sup> Electronic Supplementary Information (ESI) available: Copies of <sup>1</sup>H NMR spectra. See DOI: 10.1039/b000000x/.

1. H. J. Gross, U. Rose, J. M. Krause, J. C. Paulson, K. Schmid, R. E. Feeney and R. Brossmer, *Biochemistry*, 1989, **28**, 7386-7392.

2. H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck and W. Reutter, *J Biol Chem*, 1992, **267**, 16934-16938.
3. J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. Paruchuri and K. J. Yarema, *Glycobiology*, 2009, **19**, 1382-1401.
4. Z. Wang, J. Du, P. L. Che, M. A. Meledeo and K. J. Yarema, *Curr Opin Chem Biol*, 2009, **13**, 565-572.
5. H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato and C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**, 14846-14851.
6. D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover and C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**, 9116-9121.
7. S. T. Laughlin and C. R. Bertozzi, *ACS Chem Biol*, 2009, **4**, 1068-1072.
8. J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher and C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**, 10360-10365.
9. S. T. Laughlin and C. R. Bertozzi, *Nat Protoc*, 2007, **2**, 2930-2944.
10. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**, 16793-16797.
11. D. D. Marathe, A. Buffone, Jr., E. V. Chandrasekaran, J. Xue, R. D. Locke, M. Nasirikenari, J. T. Lau, K. L. Matta and S. Neelamegham, *Blood*, 2010, **115**, 1303-1312.
12. L. Descheny, M. E. Gainers, B. Walcheck and C. J. Dimitroff, *J Invest Dermatol*, 2006, **126**, 2065-2073.
13. Z. Guo and Q. Wang, *Curr Opin Chem Biol*, 2009, **13**, 608-617.
14. F. Maley, A. L. Tarentino, J. F. McGarrah and R. Delgiacco, *Biochem J*, 1968, **107**, 637-644.
15. D. P. Gamblin, E. M. Scanlan and B. G. Davis, *Chem Rev*, 2009, **109**, 131-163.
16. V. Bourgeaux, F. Piller and V. Piller, *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**, 5459-5462.
17. P. Busca and O. R. Martin *Tetrahedron Letters*, 2004, **45**, 4433-4436.
18. A. Berkin, W. A. Szarek and R. Kisilevsky, *Carbohydr Res*, 2000, **326**, 250-263.
19. I. Pastuszak, R. Drake and A. D. Elbein, *J Biol Chem*, 1996, **271**, 20776-20782.
20. J. B. Thoden and H. M. Holden, *J Biol Chem*, 2005, **280**, 32784-32791.
21. M. Nishimoto and M. Kitaoka, *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**, 6444-6449.
22. L. Cai, W. Guan, W. Wang, W. Zhao, M. Kitaoka, J. Shen, C. O'Neil and P. G. Wang, *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**, 5433-5435.
23. C. Peneff, P. Ferrari, V. Charrier, Y. Taburet, C. Monnier, V. Zamboni, J. Winter, M. Harnois, F. Fassy and Y. Bourne, *EMBO J*, 2001, **20**, 6191-6202.
24. W. Guan, L. Cai, J. Fang, B. Wu and P. G. Wang, *Chem. Commun.*, 2009, 6976-6978.
25. F. Feng, K. Okuyama, K. Niikura, T. Ohta, R. Sadamoto, K. Monde, T. Noguchi and S. Nishimura, *Org Biomol Chem*, 2004, **2**, 1617-1623.
26. P. D. Kingsley, K. G. Hagen, K. M. Maltby, J. Zara and L. A. Tabak, *Glycobiology*, 2000, **10**, 1317-1323.
27. S. Duclos, P. Da Silva, F. Vovelle, F. Piller and V. Piller, *Protein Eng Des Sel*, 2004, **17**, 635-646.

- 
28. P. Busca, V. Piller, F. Piller and O. R. Martin, *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13**, 1853-1856.
29. H. C. Hang, C. Yu, M. R. Pratt and C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc*, 2004, **126**, 6-7.
- 5 30. T. Kubota, T. Shiba, S. Sugioka, S. Furukawa, H. Sawaki, R. Kato, S. Wakatsuki and H. Narimatsu, *J Mol Biol*, 2006, **359**, 708-727.
31. K. G. Ten Hagen, T. A. Fritz and L. A. Tabak, *Glycobiology*, 2003, **13**, 1R-16R.
32. T. A. Fritz, J. H. Hurley, L. B. Trinh, J. Shiloach and L. A. Tabak,  
10 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**, 15307-15312.
33. F. K. Hagen, B. Hazes, R. Raffo, D. deSa and L. A. Tabak, *J Biol Chem*, 1999, **274**, 6797-6803.
34. V. Bourgeaux, M. Cadene, F. Piller and V. Piller, *Chembiochem*, 2007, **8**, 37-40.
- 15 35. G. A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller and A. F. Delmas, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 965-968.
36. O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter and M. Pawlita, *J Biol Chem*, 1995, **270**, 1308-1314.
- 20 37. S. G. Sampathkumar, A. V. Li, M. B. Jones, Z. Sun and K. J. Yarema, *Nat Chem Biol*, 2006, **2**, 149-152.

### I.1.2 Résumé de cet article

Les changements de glycosylation sont associés à beaucoup de maladies et à des mécanismes de différenciation. Il est nécessaire de recourir à des outils expérimentaux pour rechercher les implications physiologiques de ces changements soit pour marquer les glycanes modifiés dans ces processus soit pour bloquer leur biosynthèse. La *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) est un monosaccharide largement représenté dans les glycolipides, les protéoglycanes et les glycoprotéines ; une fois incorporée dans les cellules, elle peut emprunter une voie dite de « récupération » qui la convertit en UDP-GalNAc, précurseur ensuite utilisé par les glycosyltransférases pour fabriquer les glycanes. Dans l'optique de trouver de nouveaux rapporteurs capables de s'intégrer dans les glycanes cellulaires, nous avons synthétisé des analogues de GalNAc qui ont été testés en tant que substrats des deux enzymes impliquées dans la voie de récupération de la GalNAc : la galactokinase 2 (GK2) et l'uridylylpyrophosphorylase AGX1. Cette analyse effectuée *in vitro* montre que plusieurs de ces analogues sont bien acceptés par GK2 et AGX1 et que certains sont aussi incorporés dans des peptides par la polypeptide GalNAc transférase T1. Les analogues étudiés ici sont donc utiles pour mieux définir les caractéristiques structurales des substrats donneurs des enzymes impliquées dans le métabolisme de la GalNAc. Certains peuvent également s'avérer des outils intéressants d'un point de vue diagnostique ou thérapeutique car ils sont susceptibles d'être incorporés dans les cellules vivantes.

### I.1.3 Conclusion

L'analyse des propriétés catalytiques des enzymes qui utilisent les analogues présentés ici comme substrats donneurs nous ont permis de constater que certains de ces analogues pouvaient être transférés enzymatiquement sur des peptides.

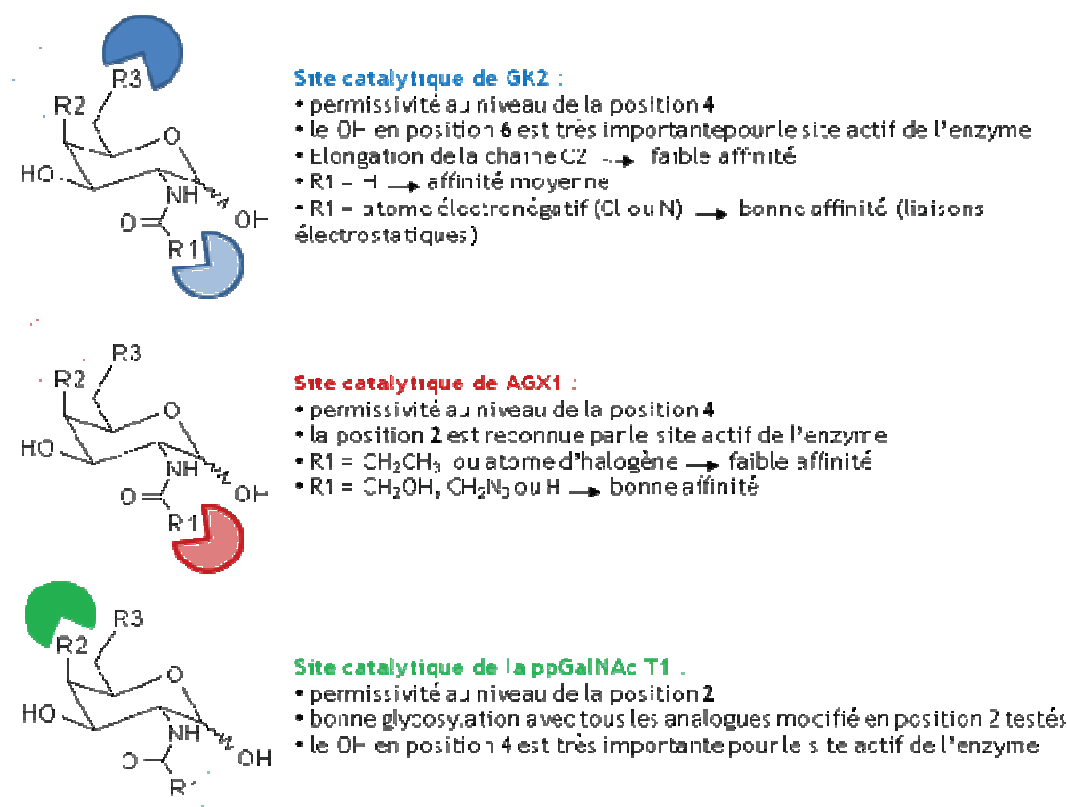
Avec quelques sucres, il a été possible d'obtenir des glycopeptides soit en une étape avec l'ensemble du cycle enzymatique soit en 2 étapes en préparant et purifiant la forme active, UDP-sucre avant qu'elle ne soit utilisée par la ppGalNAcT1. Cette dernière méthode permet d'obtenir une plus grande variété de glycopeptides avec de meilleurs taux de glycosylation.

| Dérivé de Galactosamine | Km pour GK2 (mM) | Km pour AGX1 (mM) | Substrat pour ppGalNAcT1 | Substrat pour le cycle |
|-------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>N</i> -Acétyl        | 0,24 +/- 0,03    | 1,17 +/- 0,12     | Oui                      | Oui                    |
| <i>N</i> -Propionyl     | 6,47 +/- 0,15    | 9,25 +/- 0,85     | Oui                      | Non                    |
| <i>N</i> -Chloroacétyl  | 0,49 +/- 0,07    | 5,08 +/- 0,16     | Oui                      | Non                    |
| <i>N</i> -Bromoacétyl   | 3,75 +/- 0,21    | 7,26 +/- 1,00     | Oui                      | Non                    |
| <i>N</i> -Glycolyl      | 3,54 +/- 0,51    | 0,57 +/- 0,12     | Oui                      | Oui                    |
| <i>N</i> -Azidoacétyl   | 0,32 +/- 0,01    | 2,57 +/- 0,15     | Oui                      | Non                    |
| <i>N</i> -Formyl        | 1,08 +/- 0,14    | 2,32 +/- 57       | Oui                      | Oui                    |
| <i>N</i> -Butyryl       | 4,70 +/- 0,50    | > 50 mM           | Non                      | Non                    |
| 4-DéoxyGalNAc           | 1,88 +/- 0,39    | 3,21 +/- 0,12     | Non                      | Non                    |
| 6-DéoxyGalNAc           | > 10 mM          | non déterminé     | Non                      | Non                    |
| 4-FluoroGalNAc          | 1,10 +/- 0,02    | 1,99 +/- 0,24     | Non                      | Non                    |

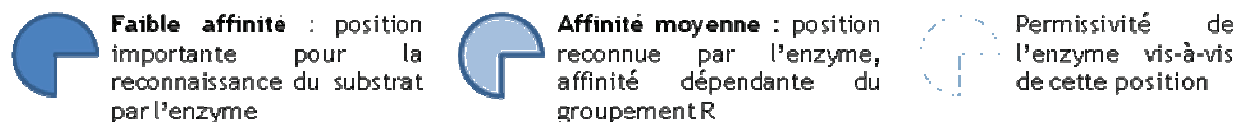
**Tableau 11.** Récapitulatif des résultats obtenus avec les analogues testés sur les 3 enzymes GK2, AGX1 et ppGalNAcT1 du cycle.

## Résultats et discussion

Le schéma ci-dessous résume les divers résultats.



Légende:



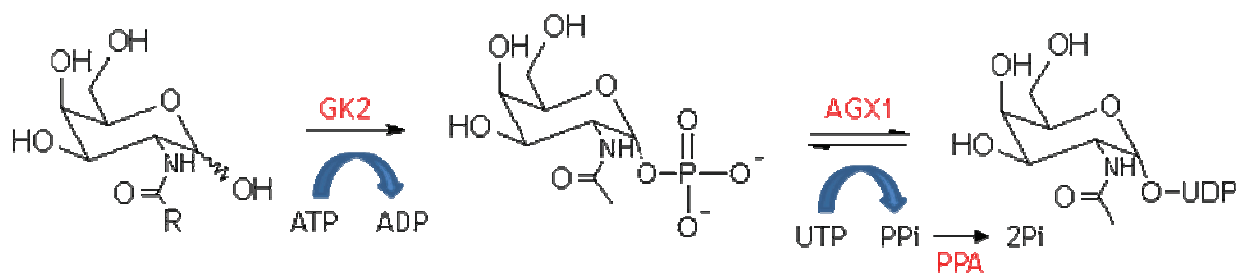
Par la suite, 4 parmi les meilleurs substrats, c'est-à-dire le *N*-Glycolyl, le *N*-Formyl, le *N*-Propionyl et le *N*-Azido ont été utilisés pour des études biologiques en vue d'applications thérapeutiques. Le *N*-Bromoacétyl et le *N*-Chloroacétyl seront étudiés dans un 2<sup>ème</sup> temps.

Pour obtenir des glycopeptides nécessaires aux études biologiques, la synthèse a pu se faire soit en une étape avec l'ensemble du cycle enzymatique soit en 2 étapes en préparant et purifiant la forme active, UDP-sucre avant qu'elle ne soit utilisée par la ppGalNAcT1. Cette dernière méthode permet d'obtenir une plus grande variété de glycopeptides avec de meilleurs taux de glycosylation.

## I.2 Synthèse de nucléotides sucres

Nous avons donc vu que pour synthétiser une plus grande variété de glycopeptides avec les analogues, il est préférable de préparer et de purifier les sucres sous leur forme active UDP-sucres avant de les incuber en présence de la ppGalNAc T1. De plus, avec cette méthode, les peptides sont mieux glycosylés qu'en partant de la forme sucre simple et en l'incubant avec toutes les enzymes. Nous avons donc synthétisé et caractérisé différents nucléotides sucres.

Les différents analogues sont incubés en présence des 2 enzymes GK2 et AGX1. GK2 permet de phosphoryler le sucre en position 1 en utilisant l'ATP comme donneur de phosphate. AGX1 catalyse la fixation de l'UDP à partir d'UTP et du sucre-1P. Une troisième enzyme est nécessaire : la PPA afin de déplacer la réaction dans le sens de synthèse de l'UDP-sucre par dégradation du PPi.



Après réaction, plusieurs étapes de purification sont nécessaires. Tout d'abord, le milieu réactionnel est passé sur une matrice échangeuse d'anions par FPLC afin de séparer les espèces chargées dérivées de l'ATP et de l'UTP (figure 34). Les fractions collectées contiennent l'UDP-sucre mais surement encore du sucre qui n'a pas réagi ainsi qu'un peu d'UMP et d'AMP.

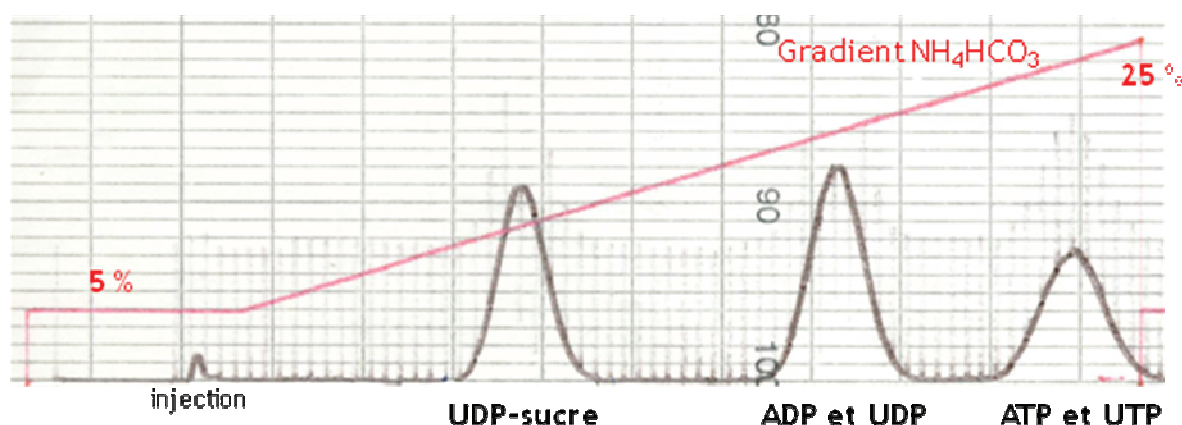
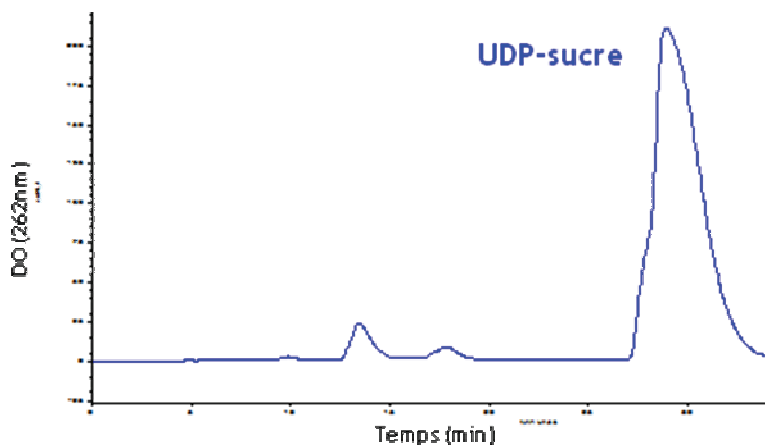


Figure 34. Profil de purification des UDP-sucres par gel échangeur d'anions (DO à 254 nm).

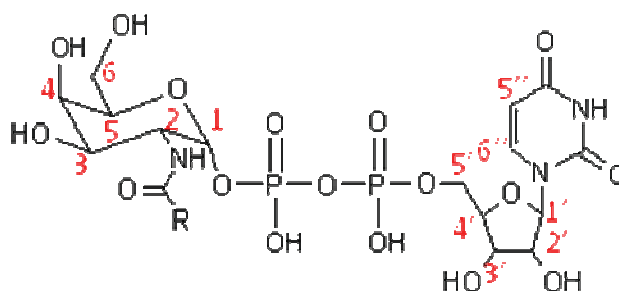
## Résultats et discussion

Après dessalage des fractions contenant l'UDP-sucre (gel filtration sur Séphadex G-10), celui-ci est purifié par HPLC semi-préparative sur une colonne de C18 afin d'éliminer le sucre restant. Cette purification est réalisée en isocratique en ATEA 20 mM. Le sucre reste fixé sur la colonne alors que l'UDP-sucre est élué (figure 35).



**Figure 35.** Profil HPLC de sortie des UDP-sucre (DO à 262 nm).

Le pic d'UDP est collecté puis dessalé (gel filtration sur Séphadex G-10). Puis les UDP-sucre sont caractérisés par spectrométrie de masse et RMN ( $^1\text{H}$ -RMN,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (tableau 12).



| proton                           | UDP-<br>GalNAc<br>(ppm)    | UDP-<br>Glycolyl<br>(ppm)         | UDP-<br>Formyl<br>(ppm) | UDP-<br>Propionyl<br>(ppm)                         | UDP-<br>AzidoAc<br>(ppm)          | UDP-<br>ChloroAc<br>(ppm)         | UDP-<br>BromoAc<br>(ppm)          |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| H <sub>1</sub>                   | 5,48                       | 5,57                              | 5,68                    | 5,65                                               | 5,68                              | 5,33                              | 5,57                              |
| H <sub>2</sub>                   | 4,18                       | 4,28                              | 4,39                    | 4,37                                               | 4,40                              | 4,02                              | 4,36                              |
| H <sub>3</sub>                   | 3,90                       | 4,04                              | 4,06                    | 4,08                                               | 4,10                              | 3,76                              | 4,11                              |
| H <sub>4</sub>                   | 3,97                       | 4,06                              | 4,08                    | 4,15                                               | 4,16                              | 3,80                              | 4,14                              |
| H <sub>5</sub>                   | 4,13                       | 4,21                              | 4,31                    | 4,31                                               | 4,31                              | 3,95                              | 4,24                              |
| H <sub>6a</sub> et <sub>6b</sub> | 3,73-3,65                  | 3,79-3,76                         | 3,90-3,84               | 3,89-3,86                                          | 3,88-3,86                         | 3,55-3,47                         | 3,90-3,86                         |
| H <sub>1'</sub>                  | 5,92                       | 5,98                              | 6,09                    | 6,09                                               | 6,09                              | 5,74                              | 6,07                              |
| H <sub>2'</sub>                  | 4,30                       | 4,37                              | 4,47                    | 4,48                                               | 4,48                              | 4,12                              | 4,46                              |
| H <sub>3'</sub>                  | 4,30                       | 4,37                              | 4,47                    | 4,48                                               | 4,48                              | 4,12                              | 4,46                              |
| H <sub>4'</sub>                  | 4,22                       | 4,32                              | 4,44                    | 4,39                                               | 4,44                              | 4,04                              | 4,38                              |
| H <sub>5'</sub>                  | 4,14-4,11                  | 4,23-4,19                         | 4,34-4,31               | 4,34-4,31                                          | 4,34-4,30                         | 3,97-3,94                         | 4,31-4,24                         |
| H <sub>5''</sub>                 | 5,90                       | 5,96                              | 6,07                    | 6,07                                               | 6,08                              | 5,71                              | 6,06                              |
| H <sub>6''</sub>                 | 7,89                       | 7,95                              | 8,11                    | 8,07                                               | 8,06                              | 7,73                              | 8,04                              |
| R                                | 2,02<br>(CH <sub>3</sub> ) | 4,18 ; 4,15<br>(CH <sub>2</sub> ) | 8,31<br>(H)             | 2,47 (CH <sub>2</sub> )<br>1,23 (CH <sub>3</sub> ) | 4,25 ; 4,16<br>(CH <sub>2</sub> ) | 4,01 ; 3,99<br>(CH <sub>2</sub> ) | 4,31 ; 4,27<br>(CH <sub>2</sub> ) |
| ESI, neg<br>(Da)                 | 607                        | 622,5                             | 592,5                   | 620,5                                              | 647,5                             | 640,1<br>642,2                    | 683<br>685                        |

**Tableau 12.** Caractérisation par RMN et par spectrométrie de masse des différents UDP-sucres synthétisés.

## Résultats et discussion

A chaque étape, la quantification des UDP-sucre est réalisée par mesure de la DO à 260 nm ( $\epsilon=9900 \text{ L moles}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (tableau 13).

| Analogues     | Concentration finale pour la réaction (mM) | Rendement après High trap QXL + G-10 (%) | Rendement après C18 + G-10 (%) |
|---------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| UDP-GalNAc    | 5                                          | 48                                       | 43                             |
| UDP-Glycolyl  | 10                                         | 28                                       | 16                             |
| UDP-Formyl    | 15                                         | 32                                       | 16                             |
| UDP-Propionyl | 15                                         | 22                                       | 11                             |
| UDP-AzidoAc   | 10                                         | 26                                       | 20                             |
| UDP-ChloroAc  | 15                                         | 44                                       | 22                             |
| UDP-BromoAc   | 15                                         | 19                                       | 5                              |

**Tableau 13.** Rendement de synthèse des UDP-sucre après les différentes étapes de purification.

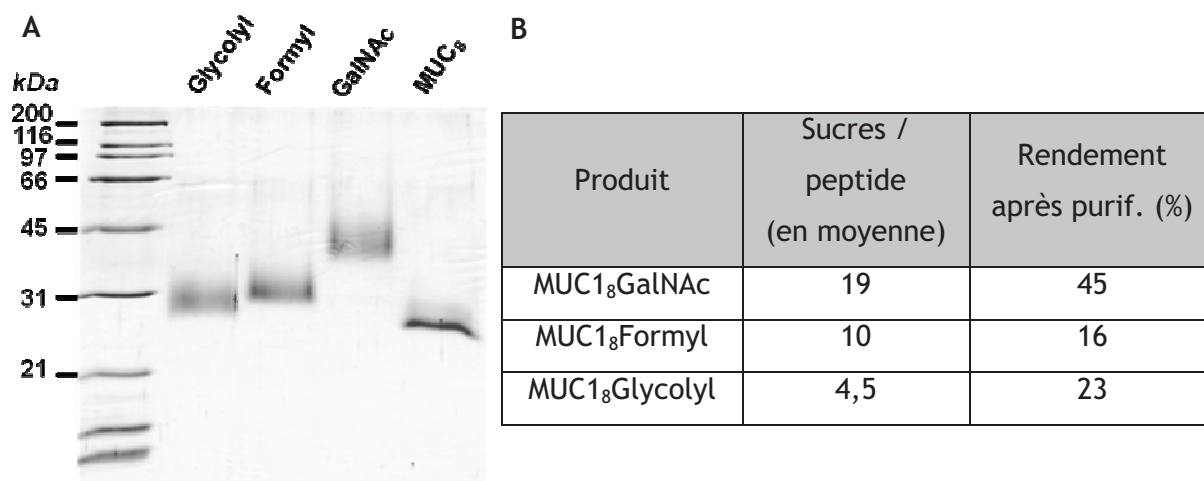
Les rendements de synthèse des UDP-sucre sont plutôt faibles si l'on se réfère aux résultats obtenus sur l'UDP-GalNAc et l'UDP-AzidoAc (Bourgeaux *et al.*, 2005). Néanmoins ces meilleurs rendements avaient été obtenus avec des étapes de purification différentes et moins nombreuses puisque l'UDP-sucre était seulement purifié sur résine échangeuse d'ions puis par gel filtration. Dans notre cas nous avons rajouté une étape de purification par HPLC qui semble nécessaire notamment pour éliminer le sucre-1P qui n'a pas réagi et qui s'élue de la colonne d'échange d'ions en même temps que l'UDP-sucre. En HPLC par contre, le sucre reste fixé à la colonne. De plus, les rendements de production des UDP-sucre ne sont probablement pas de 100% et pourraient certainement être optimisés en faisant varier les conditions d'incubation. Malgré tout, nos rendements sont similaires à ceux obtenus par l'équipe de Wang avec 2 autres enzymes (Zhao *et al.*, 2010), (Cai *et al.*, 2009), (Guan *et al.*, 2009) et à ceux obtenus par voie de synthèse chimique (Lazarević *et al.*, 2002).

### I.3 Glycosylation de peptides

#### I.3.1 Glycosylation des MUC1<sub>8</sub> au moyen du cycle enzymatique

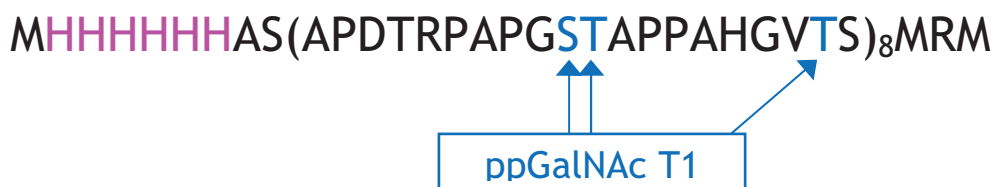
Le peptide MUC1<sub>8</sub> a été produit sous une forme recombinante par expression dans des bactéries *E.coli*. Le peptide comporte une partie 6 His qui permet sa fixation sur une résine NiNTA et donc sa purification, réalisée avec l'aide de Nicole Bureau au sein de notre équipe.

La synthèse se fait sur 2 mg de peptide afin d'avoir suffisamment de produit pour les injections envisagées par la suite dans les souris. Le peptide a été glycosylé par 3 sucres : la GalNAc, la *N*-formyl- et la *N*-glycolyl- galactosamine en utilisant le cycle enzymatique. Le peptide est incubé sur la nuit en présence d'un sucre. Le lendemain les enzymes du cycle sont précipitées par l'ajout de MeOH. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie d'affinité sur NiNTA. Cette étape permet notamment d'éliminer la SAB ajoutée au milieu d'incubation pour stabiliser les enzymes. Enfin les glycopeptides sont dessalés par passage à travers une membrane de porosité 10 kDa puis analysés par gel SDS-PAGE ainsi que par spectrométrie de masse afin de déterminer le nombre de sucres fixés (figure 36).



**Figure 36.** A Gel SDS-PAGE (12 %) de MUC1<sub>8</sub> et de MUC1<sub>8</sub> glycosylé. B Tableau indiquant le nombre de sucres par peptide et le rendement de synthèse après purification.

Les MUC1<sub>8</sub> possèdent 24 sites potentiels de *O*-glycosylation. La ppGalNAc T1 permet de glycosyler 3 positions (sur les 5 possibles) par motif MUC1 (figure 37) (Wandall *et al.*, 1997), (Hanisch *et al.*, 1999).



**Figure 37.** Représentation des sites de O-glycosylation de MUC1 par la ppGalNAc T1.

D'autres analogues ont été testés dans tout le cycle enzymatique mais seuls le formyl et la glycolyl sont substrats. Néanmoins, les taux de glycosylation sont variables allant de la moitié (avec le formyl) au quart (avec le glycolyl) de ce qui est fixé pour la GalNAc. En effet nous avons vu que ces 2 analogues sont tout de même moins tolérés que la GalNAc par les enzymes GK2 et AGX1. Cependant, glycolyl formyl montrent une efficacité catalytique similaire pour GK2 et AGX1 si bien qu'on peut supposer que la différence de glycosylation de MUC1<sub>8</sub> entre ces 2 sucres est due à une meilleure tolérance du groupement formyl par la ppGalNAc T1.

### 1.3.2 Glycosylation du peptide STP<sub>5</sub>AG

Le peptide synthétique (STP)<sub>5</sub>AG a été glycosylé en utilisant la ppGalNAcT1 à partir de la forme activée des sucres, c'est à dire les UDP-sucres et non pas à partir du cycle. Cette méthode permet d'obtenir un glycopeptide avec une plus grande densité de sucre ainsi que de glycosyler ce peptide avec des sucres qui sont de moins bons substrats vis à vis de l'ensemble des enzymes du cycle comme c'est le cas du propionyl qui présente des Km très élevés pour GK2 et AGX1. En ce qui concerne l'azidoacétyl, les constantes enzymatiques estimées pour GK2 et AGX1 montrent qu'il n'est pas un mauvais substrat et il devrait donc pouvoir être utilisé dans le cycle enzymatique mais les quelques essais effectués n'ont pas donné de résultats positifs. Il faudrait donc adapter les conditions du cycle pour chacun des substrats (concentration en substrats, quantités d'enzymes, temps d'incubation etc...). Par contre, en glycosylant à partir des UDP-sucres, on s'affranchit d'une part des problèmes d'affinité entre GK2, AGX1 et ppGalNAc T1 pour les différents analogues et d'autre part on inclut des étapes de purification pour la préparation des UDP-sucres ce qui améliore considérablement les résultats obtenus avec la ppGalNAc T1. Les glycopeptides obtenus à partir des UDP-analogues montrent un bon taux d'incorporation avec tous les analogues.

Les peptides (1 à 2 mg) sont incubés 24 h en présence de l'UDP-sucre et de la ppGalNAcT1. Les enzymes et une partie de la SAB utilisée dans cette réaction pour stabiliser les enzymes sont ensuite précipitées au méthanol. Le mélange restant est passé

## Résultats et discussion

à travers une membrane de porosité 10 kDa qui permet de séparer le STP<sub>5</sub> glycosylé de la SAB encore présente, puis le glycopeptide est dessalé par filtration sur gel.

Le (STP)<sub>5</sub>AG n'est quantifiable que par pesée ce qui donne, étant données les petites quantités que nous avons utilisées, des résultats entachés d'erreurs considérables. Ainsi avons-nous évalué, après plusieurs essais qu'approximativement 80 % du produit est récupéré à la suite de la glycosylation (tableau 14).

| Produit                         | Sucres/peptide<br>(nombre moyen) | Rendement après purif. (%) |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| (STP) <sub>5</sub> AG-GalNAc    | 4                                | ~80                        |
| (STP) <sub>5</sub> AG-Glycolyl  | 3                                | ~80                        |
| (STP) <sub>5</sub> AG-Formyl    | 3                                | ~80                        |
| (STP) <sub>5</sub> AG-Propionyl | 3                                | ~80                        |
| (STP) <sub>5</sub> AG-AzidoAc   | 3                                | ~80                        |

**Tableau 14.** Tableau indiquant le nombre de sucres par peptide et le rendement de synthèse après purification.

### I.3.3 Glycosylation du peptide MUC1<sub>9</sub>

Le peptide MUC1<sub>9</sub> a également été glycosylé en utilisant la ppGalNAcT1 à partir de la forme activée des sucres. Les peptides (0,2 mg) sont incubés 24 h en présence de l'UDP-sucres et de la ppGalNAcT1. Les enzymes et la SAB sont ensuite précipitées au méthanol. Le mélange restant est purifié par dialyse contre de l'eau. La glycosylation est vérifiée sur gel SDS-PAGE (voir article). Les rendements ont été estimés d'après le gel SDS-PAGE en utilisant le logiciel Image Quant (tableau 15).

| Produit                     | Sucres/peptide<br>(nombre moyen) | Rendement après purif.<br>(%) |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| MUC1 <sub>9</sub> GalNAc    | 34,5                             | 99                            |
| MUC1 <sub>9</sub> Glycolyl  | 27,5                             | 67                            |
| MUC1 <sub>9</sub> Formyl    | 30,5                             | 74                            |
| MUC1 <sub>9</sub> Propionyl | 34                               | 96                            |
| MUC1 <sub>9</sub> AzidoAc   | 23                               | 90                            |

**Tableau 15.** Récapitulatif des différents peptides testés ainsi que leur taux de glycosylation.

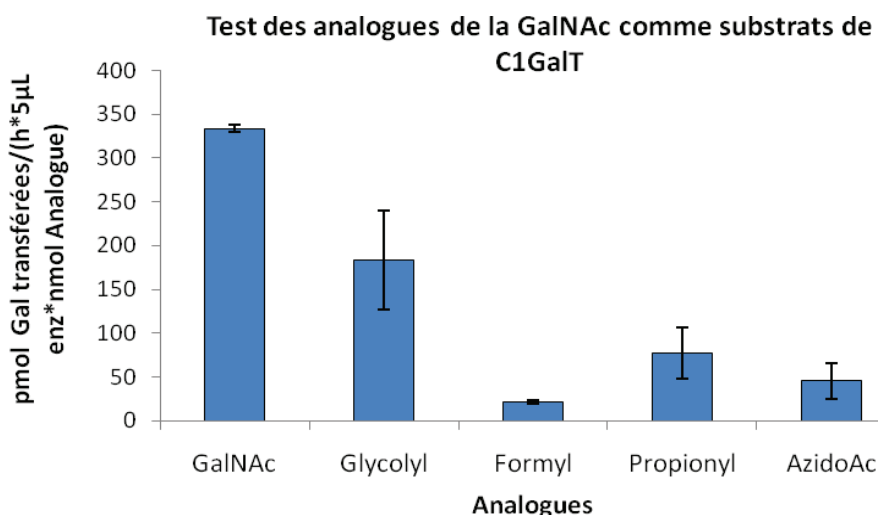
Les rendements sont très bons. En effet les MUC1<sub>9</sub> ont subi très peu d'étapes de purification. Après dialyse, la majorité du produit est récupérée dans le boudin.

### I.3.4 Synthèse de O-glycanes à partir des analogues

Nous avons donc pu fixer différents analogues sur des peptides par O-glycosylation de type mucine. Une fois le premier sucre fixé, les glycanes formés constituent des analogues de l'antigène Tn. Nous avons testé si ces glycanes pouvaient être allongés notamment par l'ajout d'un galactose ou d'un acide sialique pour ainsi former des analogues d'antigènes tumoraux connus.

Pour cela, les analogues, une fois incorporés sur un peptide, ont été étudiés en tant que substrats de 2 enzymes qui interviennent dans la synthèse des différentes structures core : la B1-3 galactosyltransférase ou C1GalT-1 qui catalyse l'addition d'un galactose à partir de sa forme activée, UDP-Gal, sur la GalNAc liée en  $\alpha$  sur Ser /Thr et une sialyltransférase, la ST6GalNAc I, qui transfère un acide sialique à partir de sa forme activée, CMP-Neu5Ac sur la GalNAc liée en  $\alpha$  sur Ser /Thr. Les glycopeptides utilisés sont les MUC1<sub>9</sub> glycosylés à partir des différents UDP-sucres.

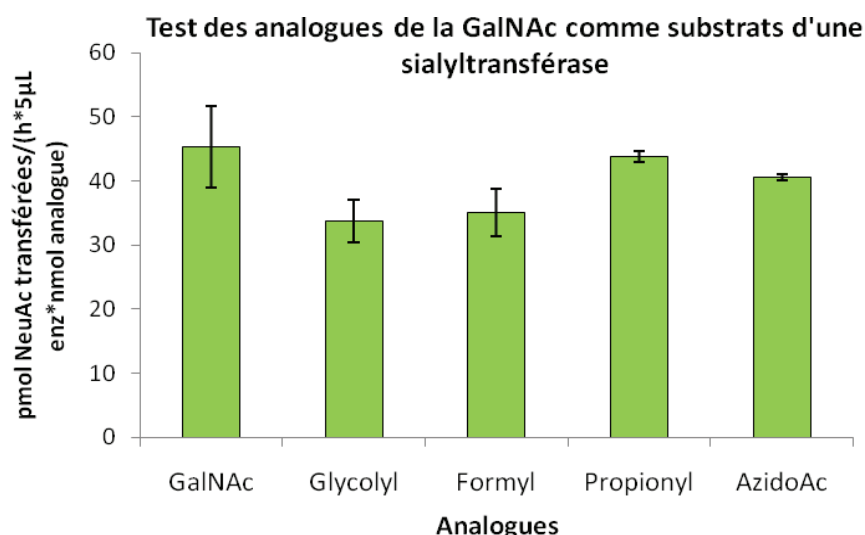
C1GalT a été produite par transfection de cellules HEK avec un vecteur d'expression eucaryote codant pour une forme soluble de la C1GalT de drosophile. Le milieu de culture a été directement utilisé pour les tests de transfert d'UDP[<sup>14</sup>C]Gal sur des peptides glycosylés par les différents analogues (Figure 38).



**Figure 38.** Représentation de la quantité de galactose (en nmoles) transférée sur des MUC1<sub>9</sub> glycosylés par différents analogues par heure et par rapport à la quantité de sucres en présence, pour 5 µL de milieu de culture contenant la C1GalT.

Alors que le GalNAc est un bon substrat pour l'enzyme, les autres analogues sont de moins bons voire de mauvais substrats. C'est notamment le cas du formyl, du propionyl et de l'azido. Dans la littérature, il a été montré que la séquence peptidique ainsi que la glycosylation du peptide avaient une influence sur l'activité de l'enzyme (Granovsky *et al.*, 1994). Ainsi la longueur du peptide ou la présence d'une proline à côté d'un site de glycosylation affectent l'activité de l'enzyme. Par contre l'augmentation du nombre de sucres par peptide n'augmente pas l'activité de l'enzyme. Cependant ces paramètres n'entrent probablement pas en jeu dans notre étude, le peptide étant identique et présentant en moyenne un nombre de sucres similaire d'un analogue à un autre. Les résultats laissent donc supposer que le groupement sur la partie amino du sucre participe à la reconnaissance de celui-ci par le site catalytique de l'enzyme C1 GalT. Cependant, même si les résultats d'analyse par spectrométrie de masse ont fourni un nombre moyen (et de surcroît assez hétérogène) de substitutions par mole de peptide, nous n'avons pas vérifié si les positions glycosylées par la ppGaNT1 étaient les mêmes pour les différents analogues de GalNAc ; aussi nous ne pouvons exclure une influence de la densité de glycosylation des glycopeptides accepteurs sur la reconnaissance par C1GalT.

ST6GalNAc I nous a été fournie par le Dr Anne Harduin Lepers, UMR 8576, université de Lille. Il s'agit de l'enzyme humaine exprimée sous une forme soluble par des cellules de drosophile. Le milieu de culture des cellules productrices a été concentré 15 fois après décongélation, par diafiltration à 4 °C sur une membrane de porosité 10 kDa, en présence de 1 mM DTT. La solution ainsi concentrée a été ajustée à 30 % de glycérol et conservée à -20°C. La ST6GalNAc I utilise le substrat accepteur GalNAc-O-glycoprotéine pour former l'antigène sialyl Tn (Neu5Acα2-6GalNAc-O-glycoprotéine). La solution concentrée a été directement utilisé pour les tests de transfert du CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc sur des peptides glycosylés par les différents analogues (Figure 39).



**Figure 39.** Représentation de la quantité d'acide sialique (en nmoles) transférée sur des MUC1, glycosylés par différents analogues par heure et par rapport à la quantité de sucres en présence, pour 5 µL de solution de ST6GalNAc I.

Les résultats montrent que les analogues sont tous de très bons substrats de l'enzyme. Le groupement modifié n'influence pas l'activité de l'enzyme et donc à priori n'est pas reconnu par le site actif de l'enzyme.

### 1.3.5 Conclusion

Ces études menées in vitro, ont montré qu'il est possible de produire, par synthèse enzymatique, plusieurs glycopeptides à partir des analogues de GalNAc préalablement synthétisés. Une bonne glycosylation a été possible en passant par la préparation et la purification des sucres sous leur forme activée, UDP-sucres.

Les glycopeptides obtenus avec les analogues se sont aussi avérés être substrats de 2 autres enzymes la B1-3 galactosyltransférase C1GalT et la sialyltransférase ST6GalNAc I, qui interviennent toutes 2 dans la synthèse des O-glycanes de type mucine.

Ainsi, non seulement les analogues peuvent être métabolisés par les enzymes de la voie de sauvetage de la GalNAc mais ils peuvent aussi être incorporés dans les peptides et dans les O-glycanes portés par ces peptides. S'ils peuvent être aussi incorporés dans les cellules tumorales, ils pourraient donc se comporter comme des leurres du système immunitaire.

## II. Essais d'immunisations de souris

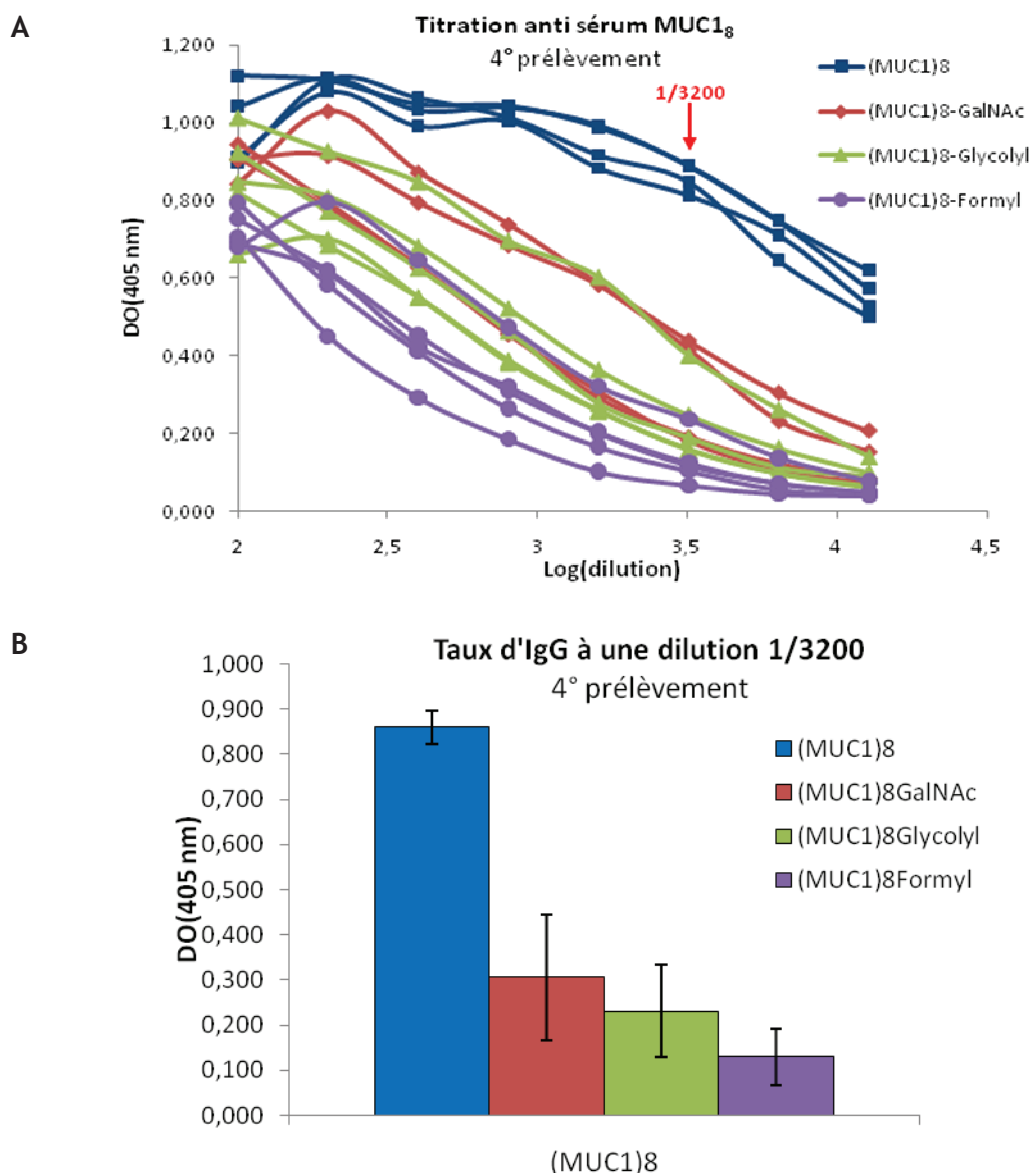
### II.1 Evaluation immunologique des MUC1<sub>8</sub> glycosylés

Les MUC1<sub>8</sub> glycosylés ont été injectés en sous cutané à des souris C57Bl6. Chaque souris (5 souris par produit) a reçu 25 µg de peptide en présence d'alum à 4 reprises à 3 semaines d'intervalle (tableau 16). L'alum est un sel d'aluminium couramment utilisé dans des vaccins comme adjuvant afin d'augmenter la réponse immune (Clements et Griffiths, 2002). C'est un adjuvant utilisé pour des vaccins administrés à l'homme et dont le pouvoir immuno-stimulant est relativement modéré.

| Produit                    | Sucres / peptide | Quantité de peptide glycosylé /souris /injection (nmoles) | Quantité de sucres /souris /injection (nmoles) |
|----------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| MUC1 <sub>8</sub> GalNAc   | 19               | 1,23                                                      | 23,3                                           |
| MUC1 <sub>8</sub> Formyl   | 10               | 1,36                                                      | 13,6                                           |
| MUC1 <sub>8</sub> Glycolyl | 4,5              | 1,43                                                      | 6,43                                           |

**Tableau 16.** Evaluation des quantités de produits injectées aux souris.

Les sérums des souris sont prélevés par le sinus rétro-orbital, 2 semaines après chaque injection. Les sérums sont dosés par tests ELISA pour quantifier leur taux en immunoglobulines IgG (figure 40). Au fond de la plaque, le peptide MUC1<sub>8</sub> est déposé afin de déterminer le taux d'IgG vis à vis de l'épitope MUC1<sub>8</sub>. Des dilutions en série des sérums sont réalisées.

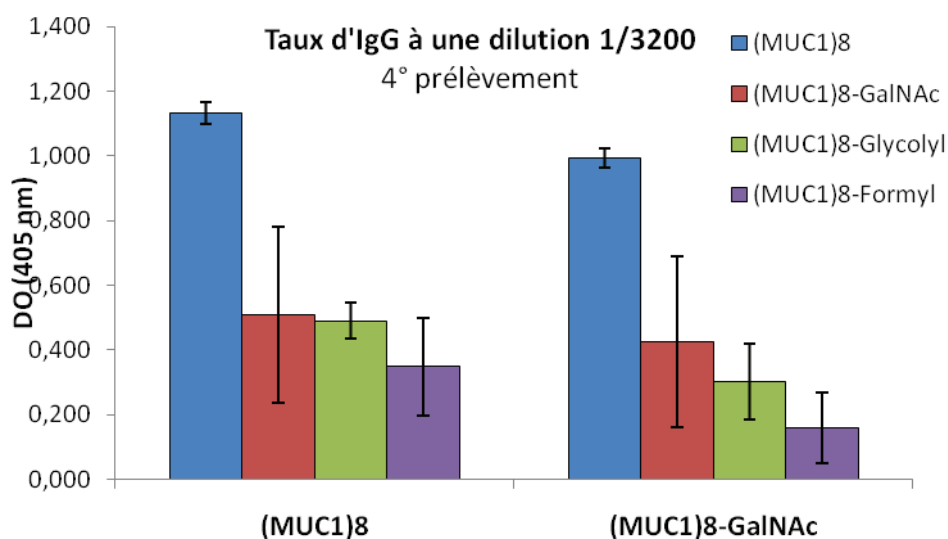


**Figure 40.** A Résultats du dosage des IgG anti-MUC1<sub>8</sub> présentes dans les sérums des souris injectés par MUC<sub>8</sub> et les MUC<sub>8</sub> glycosylés. Les sérums du 4<sup>ème</sup> prélèvement sont dilués de 2 en 2 à partir d'une dilution 1/100. B Représentation du taux d'IgG à une dilution 1/3200 des sérums (moyenne sur l'ensemble des souris). Plaques recouvertes avec MUC1<sub>8</sub>, 50 ng par puits, révélation par Ac anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000.

La réponse immune est plutôt homogène au sein d'un même lot de souris. Le peptide MUC1<sub>8</sub> est très immunogène. Néanmoins dès qu'on lui ajoute un sucre la réponse contre l'épitope peptidique est considérablement diminuée, quelque soit le sucre. Même avec un peptide faiblement glycosylé, comme c'est le cas avec le glycolyl, l'ajout de sucres semble inhiber la réponse immune vis-à-vis du peptide. Pour vérifier ce qu'il en est pour les glycopeptides, une comparaison de l'affinité des anticorps obtenus après injection des

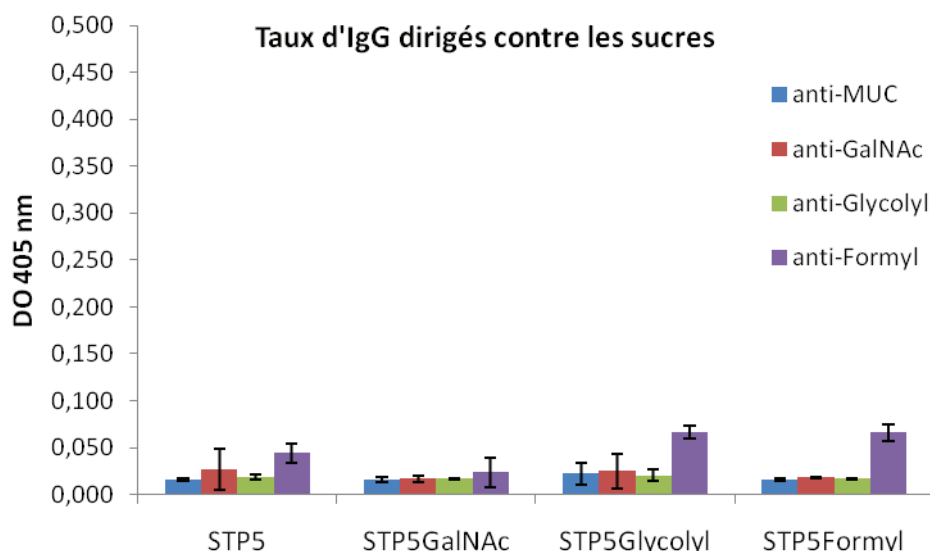
## Résultats et discussion

MUC non glycosylés et glycosylés par GalNAc, formyl et glycolyl vis-à-vis d'un MUC non glycosylé et d'un MUC glycosylé avec de la GalNAc a été réalisée (figure 41).



**Figure 41.** Comparaison du taux d'IgG obtenu contre MUC1<sub>8</sub> à une dilution 1/3200 des sérums (moyenne sur l'ensemble des souris). Plaques recouvertes avec MUC1<sub>8</sub> et MUC1<sub>8</sub>-GalNAc, 50 ng par puits. Sérums du 4<sup>ème</sup> prélèvement, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000.

Les sérums ont été également testés en déposant sur les plaques de la SAB-(STP)<sub>5</sub> glycosylée par la GalNAc, glycolyl ou formyl (voir synthèse dans le paragraphe suivant). Ce produit permet de mesurer la réponse immune vis-à-vis de l'épitope saccharidique (seule partie commune avec les produits d'injection). L'évaluation de la réponse immune IgG vis-à-vis du sucre se fait par ELISA (antisérum de souris 1/100, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000). Les antisérums de MUC glycosylé sont testés vis-à-vis de leur sucre respectif (MUC<sub>8</sub>GalNAc sur SAB-(STP)<sub>5</sub>AG-GalNAc) (figure 42).

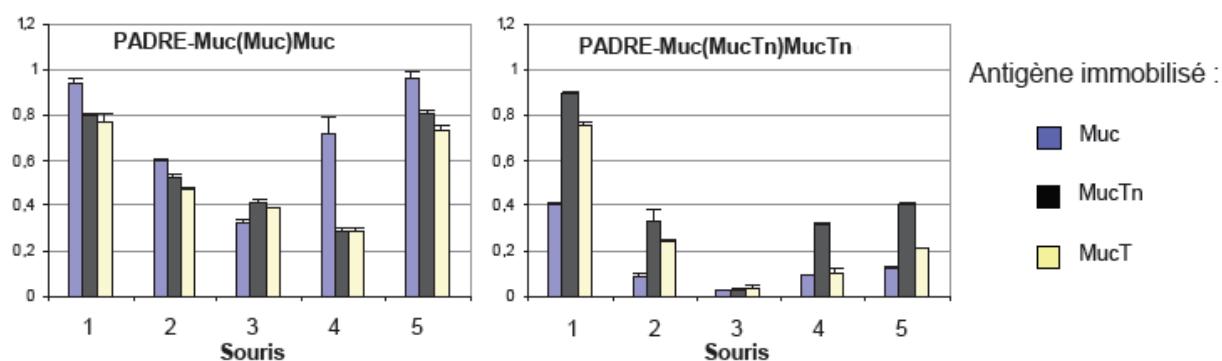


**Figure 42.** Représentation du taux d'IgG à une dilution 1/100 des sérums (moyenne sur l'ensemble des souris). Plaques recouvertes avec les SAB-(STP)<sub>5</sub>, 100 ng par puits. Sérums du 4<sup>ème</sup> prélèvement, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000.

Aucune réponse n'est obtenue contre les sucres et les anticorps produits après injection des peptides glycosylés semblent être exclusivement dirigés contre l'épitope peptidique.

De ces expériences on peut conclure que si la présence des sucres provoque une moindre réponse des anticorps contre la partie peptidique des glycopeptides injectés, elle ne permet pas pour autant d'obtenir des anticorps dirigés contre la partie saccharidique.

Des résultats similaires ont été obtenus par Gaelle-Anne Cremer au cours de son travail de thèse (Cremer, 2005). Des souris avaient été immunisées avec des peptides (PADRE-MUC(MUC)MUC) et des glycopeptides (PADRE-MUC(MUCTn)MUCTn) synthétisés chimiquement et aussi injectés avec de l'alum et les anticorps avaient été testés par ELISA vis-à-vis de MUC, MUCTn et MUCT (figure 43).



**Figure 43.** Comparaison de la réponse immune après injection d'un peptide et du même peptide glycosylé par la GalNAc vis-à-vis des épitopes MUC, MUCTn et MUCT. Plaques recouvertes avec 100 ng des divers peptides/glycopeptides, antisera dilués au 1/100°, révélation par Ac anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000.

Là aussi une nette diminution de la réponse immune est observée dans le cas des injections avec un glycopeptide. Il faut souligner que dans mes travaux, le MUC est glycosylé par la ppGalNAc T1 au niveau du motif STAP et GVTS alors que dans ceux de G.A. Cremer, les peptides étaient glycosylés sur le motif PDTR. De plus, un épitope T auxiliaire (PADRE) très efficace pour stimuler la production d'anticorps avait été ajouté aux MUC synthétisés par G.A. Cremer. Malgré ces différences de position et de technique dans la glycosylation et dans les adjuvants, la production d'anti-MUC est diminuée avec un glycopeptide. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la glycosylation entraîne un changement de conformation au niveau du peptide qui pourrait modifier la réponse immune. De plus la présentation par les CMH de classe I et II est peu spécifique des glycopeptides. La fixation des glycanes gênerait en effet d'une part la protéolyse nécessaire à la présentation d'antigène aux CMHs et même si les glycopeptides sont dégradés, ils se fixent très mal aux complexes. Il a d'ailleurs été montré, par comparaison de peptides et de glycopeptides dérivés de MUC1, que les glycopeptides n'augmentaient pas l'efficacité de la réponse immune cellulaire (Stepensky *et al.*, 2006).

Pour conclure, MUC1<sub>8</sub> est un bon immunogène cependant la réponse immune obtenue avec les produits glycosylés est diminuée même avec un peptide faiblement glycosylé. La GalNAc fixée sur le MUC forme l'antigène Tn, abondant au niveau des cellules cancéreuses mais qui n'induit pas de réponse immune efficace. Les MUC1-GalNAc n'induisent pas de réponse immune humorale de même avec les produits glycosylés par le glycolyl et le formyl. Suite aux injections de MUC1<sub>8</sub> glycosylés, il n'y a pas eu de production d'anticorps contre les sucres non plus.

De meilleurs résultats ont été reportés dans la littérature avec des MUC1 glycosylés couplés à la KLH. Ainsi des MUC1 totalement glycosylés (5 sites / motif MUC1) ont donné une bonne réponse immune (Sørensen *et al.*, 2006). L'équipe de Livingston a obtenu de bons résultats suite à l'immunisation par des MUC1 couplés à la KLH et glycosylés avec de la GalNAc par la ppGalNAcT4 et T3 (la T4 glycosyle le motif PDTR de la séquence MUC). Les anticorps obtenus sont non seulement dirigés contre la partie peptidique de MUC1 mais également contre l'antigène Tn (Kagan *et al.*, 2005). La glycosylation permet même d'obtenir plus d'anticorps contre le peptide MUC1 que lors de l'injection de MUC1-KLH non glycosylé.

Néanmoins il semble que le motif GSTA de MUC1 soit aussi un épitope immunodominant notamment lorsqu'il présente des O-glycanes courts comme c'est le cas des glycanes tumoraux (Tarp *et al.*, 2007).

D'autres injections sont donc réalisées en couplant un peptide glycosylé sur une protéine porteuse, la KLH.

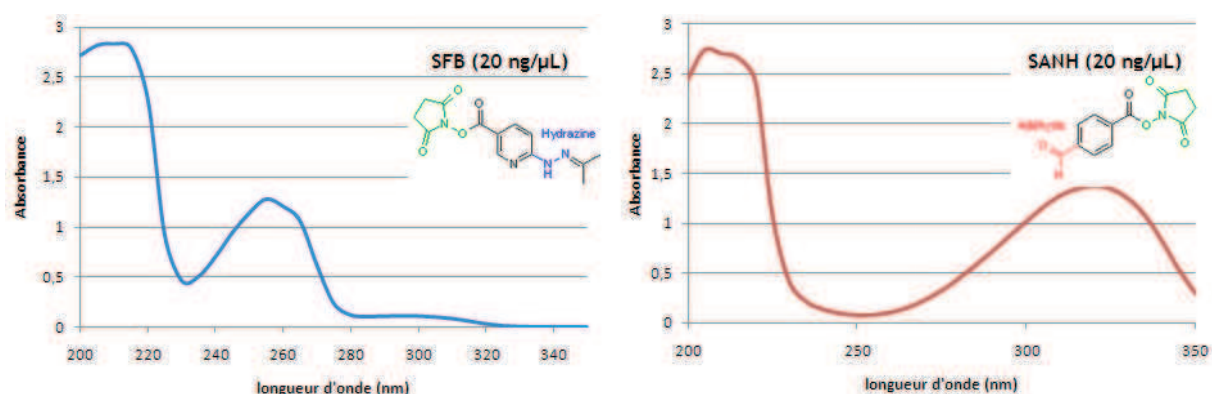
## II.2 Immunisations avec des glycopeptides couplés sur une protéine porteuse

### II.2.1 Conjugaison des glycopeptides sur KLH

Les glycopeptides à injecter aux souris sont couplés à la protéine porteuse KLH. En effet KLH a un pouvoir immunostimulant notamment pour la production d'anticorps dirigés contre des sucres. Ainsi la KLH est souvent utilisée comme protéine porteuse lors d'essais de vaccination.

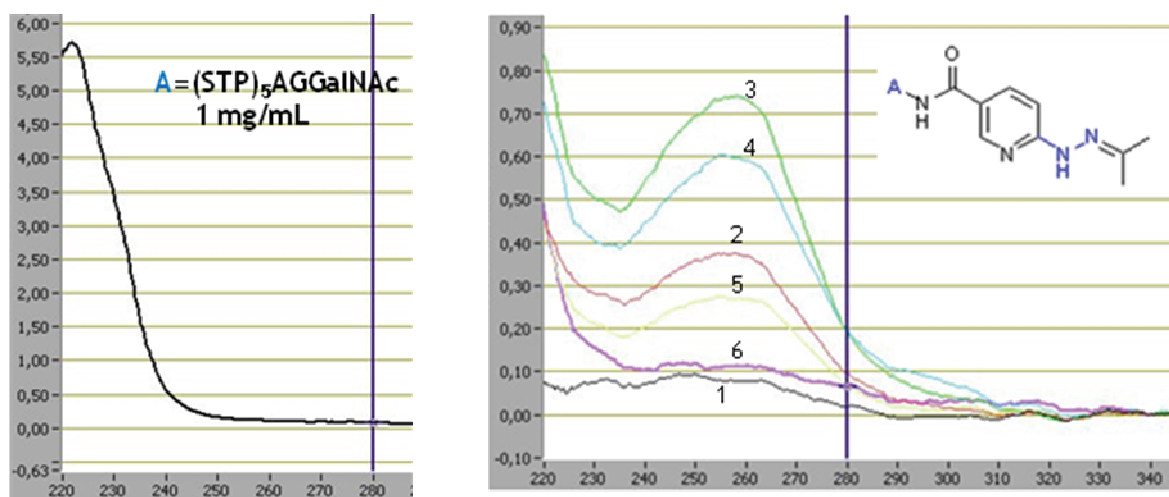
Le couplage des (STP)<sub>5</sub>AG glycosylés ou non sur la KLH se fait à l'aide du kit SureLINK™ de KLP. Ce kit comporte 2 molécules pour le couplage : succinimidyl-P-formyl benzoate, SFB et succinimidyl 4-hydrazinonicotinate, SANH (figure 44). D'après leur spectre d'absorbance, SFB présente deux pics, à 210 et à 255 nm ; SANH présente deux pics à 210 et à 325 nm. Le pic à 210 nm correspond au groupement ester de N-hydroxysuccinimide (en vert).

## Résultats et discussion



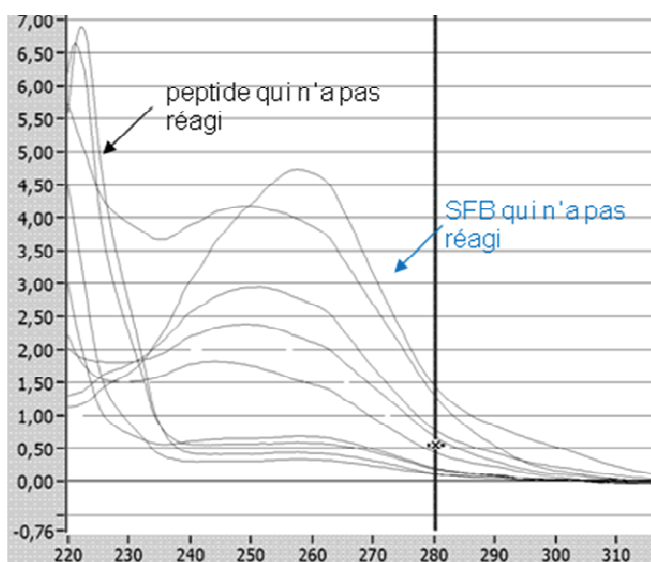
**Figure 44.** Spectre d'absorbance de SFB et de SANH.

SFB et SANH présentent un groupement ester de N-hydroxysuccinimide qui les rend réactifs vis-à-vis des groupements nucléophiles : N-ter pour (STP)<sub>5</sub>AG et N-ter et NH<sub>2</sub> en ε des lysines pour KLH. Ainsi (STP)<sub>5</sub>AG (**A**) est mis en présence de SFB et KLH (**B**) en présence de SANH. Le SFB en excès est éliminé par gel filtration et le SANH par dialyse sur une membrane de porosité 10 kDa (figures 45 à 47).

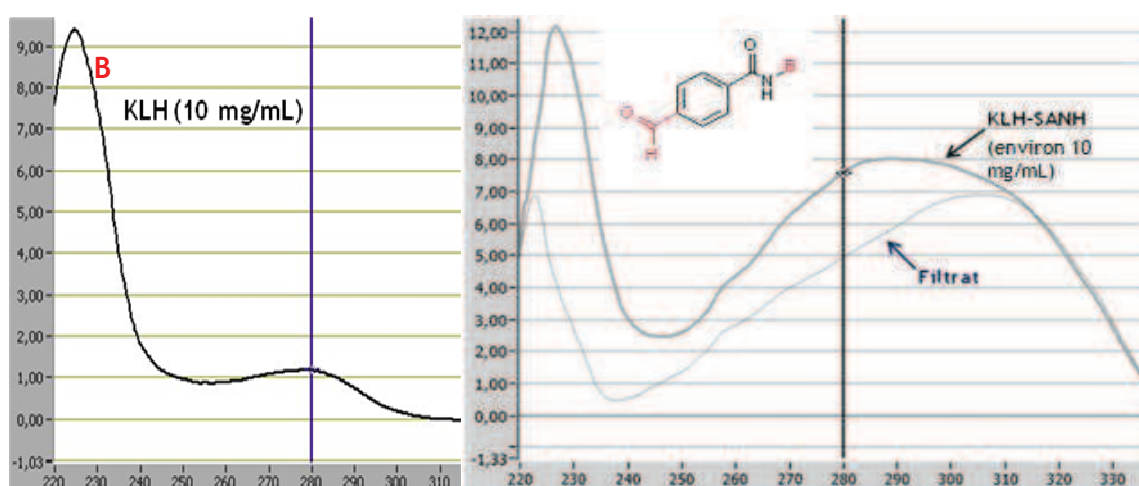


**Figure 45.** Spectre d'absorbance de (STP)<sub>5</sub>AG-GalNAc et des fractions (STP)<sub>5</sub>AG-GalNAc-SFB après gel filtration (Bio-Gel P-2), spectres enregistrés au NanoDrop entre 220 et 350 nm.

Le spectre du produit de couplage de (STP)<sub>5</sub>AG (glycosylé ou non) avec SFB présente un pic vers 255 nm dû au groupement hydrazine ce qui montre l'efficacité du couplage. De plus si on continue l'observation du spectre d'absorbance des fractions suivantes, le spectre correspondant au (STP)<sub>5</sub>AG puis au SFB qui n'ont pas réagi est obtenu (figure 46).



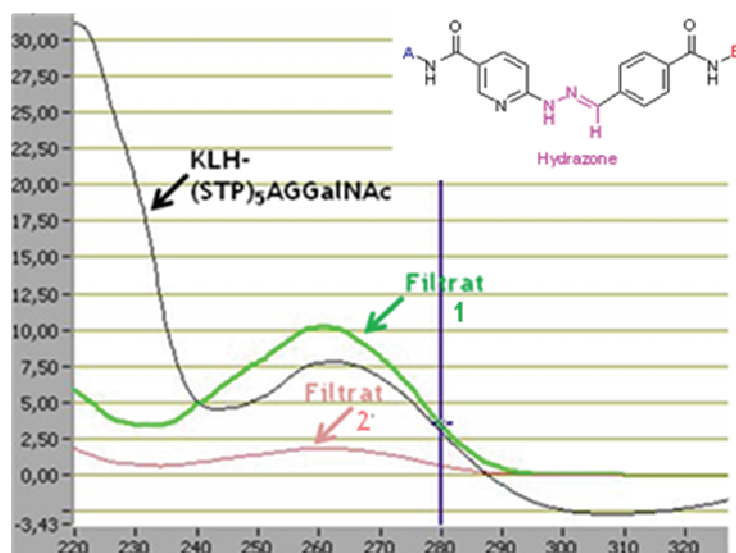
**Figure 46.** Spectre d'absorbance des fractions après élution du  $(STP)_5AG$ -GalNAc-SFB après gel filtration (Bio-Gel P-2), spectres enregistrés au NanoDrop entre 220 et 320 nm.



**Figure 47.** Spectre d'absorbance entre 220 et 330 nm de la KLH initiale et de la KLH-SANH après dialyse sur une membrane de porosité 10 kDa.

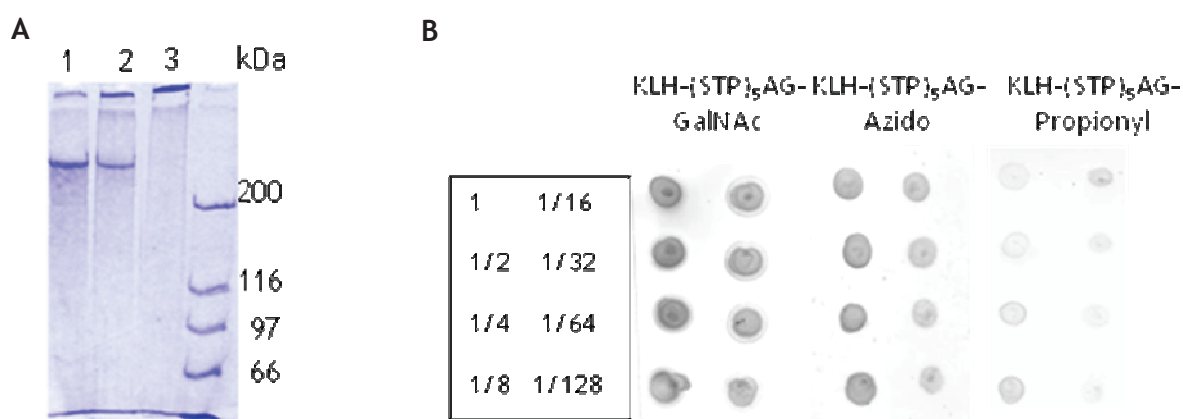
Le spectre d'absorbance du produit de couplage de KLH avec SANH présente un pic entre 280 et 320 nm ce qui montre l'efficacité du couplage. Dans le filtrat, on récupère le SANH en excès.

Le KLH-SANH est mis en présence du  $(STP)_5AG$  (glycosylé ou non) couplé à SFB. La réaction se fait sur la nuit à 4°C. Une liaison hydrazone se forme entre l'hydrazine de SFB et l'aldéhyde de SANH. Le produit de couplage est purifié par dialyse sur une membrane de porosité 10 kDa (figure 48).



**Figure 48.** Spectre d'absorbance entre 220 et 320 nm de KLH-(STP)<sub>5</sub>AG-GalNAc et des filtrats après passage sur une membrane de porosité 10 kDa.

Dans le filtrat, on récupère le (STP)<sub>5</sub>AG-SFB qui n'a pas réagi. Le produit est passé sur filtre plusieurs fois avec du tampon jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de (STP)<sub>5</sub>AG-SFB dans le filtrat (Filtrats 1 et 2). Le produit de couplage peut être caractérisé par gel SDS-PAGE ainsi que par Dot Blot révélé par VVA (1/300, 6,7 mg/mL) dans le cas des (STP)<sub>5</sub>AG glycosylés (figure 49).



**Figure 49.** A Gel SDS-PAGE (5 %) du couplage de STP<sub>5</sub> sur KLH, 1 : KLH non couplée, 2 : KLH-SANH, 3 : KLH-(STP)<sub>5</sub>AG ; B Dot Blot révélé par VVA de différents KLH-(STP)<sub>5</sub>AG glycosylés (dilutions de 2 en 2 d'une solution initiale à 5 mg/μL)

## Résultats et discussion

### Quantification :

La quantité de SFB fixé sur (STP)<sub>5</sub>AG peut être évaluée à l'aide d'une solution de 2-hydrazinopyridine,2HCl. En effet cette molécule forme un complexe avec SFB qui absorbe à 350 nm. Ainsi on peut estimer la quantité de (STP)<sub>5</sub>AG-SFB récupéré après couplage de SFB sur (STP)<sub>5</sub>AG ainsi que la quantité de (STP)<sub>5</sub>AG-SFB qui n'a pas réagi avec KLH-SANH. On en déduit alors la quantité de (STP)<sub>5</sub>AG fixé sur KLH (tableau 17).

| Produits                                                         | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-GalNAc | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-Glycolyl | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-Formyl | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-Propionyl | KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-AzidoAc | KLH-(STP) <sub>5</sub> |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| nmoles de KLH                                                    | 2,4                       | 2,4                              | 2,4                                | 2,4                              | 2,4                                 | 2,4                               | 2,4                    |
| nmoles de (STP) <sub>5</sub> AG fixées sur les 2,4 nmoles de KLH | 142                       | 154                              | 88                                 | 119                              | 129                                 | 128                               | 210                    |
| Nbre de sucres par (STP) <sub>5</sub> AG                         | 0                         | 4                                | 3                                  | 3                                | 3                                   | 3                                 | 0                      |
| nmoles de sucres sur les 2,4 nmoles de KLH                       | 0                         | 616                              | 264                                | 357                              | 387                                 | 384                               | 0                      |
| Nbre d'équivalents de (STP) <sub>5</sub> AG par KLH              | 59                        | 64                               | 37                                 | 50                               | 54                                  | 53                                | 87                     |
| Nbre d'équivalents sucres par KLH                                | 0                         | 257                              | 110                                | 149                              | 161                                 | 160                               | 0                      |

**Tableau 17.** Estimation du rendement de couplage des (STP)<sub>5</sub>AG sur la KLH.

Les valeurs obtenues ne sont qu'une estimation. En effet cette méthode de calcul repose sur l'hypothèse que tout le (STP)<sub>5</sub>AG non couplé est récupéré après dialyse et que toute la KLH utilisée a bien servi lors du couplage. Néanmoins il faut noter que seulement environ un tiers sur les 156 lysines disponibles sur la KLH ont un groupement (STP)<sub>5</sub>AG fixé.

## Résultats et discussion

Les produits d'injection sont donc en moyenne couplés à raison de 1 peptide/3 sites potentiels et le glycopeptide est présent en faible densité.

Les (STP)<sub>5</sub>AG glycosylés couplés à la KLH ont été injectés en sous cutané à des souris C57Bl6. Chaque souris a reçu l'équivalent de 10 µg de peptide couplé à la KLH en présence de l'adjuvant de Freund complet pour la première injection, incomplet pour les 3 suivantes (tableau 18). L'adjuvant de Freund est composé d'une émulsion dans l'huile minérale d'une solution aqueuse et d'un agent pathogène inactivé de la tuberculose dans le cas du Freund complet. Les sérums des souris sont prélevés par le sinus rétro-orbital, 2 semaines après chaque injection. Les sérums sont dosés par tests ELISA pour quantifier leur taux en immunoglobulines IgG.

| Produits                           | Sucres / peptide | Quantité de peptide glycosylé /souris /injection (nmoles) | Quantité de sucres /souris /injection (nmoles) |
|------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| KLH-(STP) <sub>5</sub> AG          | 0                | 6,37                                                      | 0                                              |
| KLH-(STP) <sub>5</sub>             | 0                | 6,92                                                      | 0                                              |
| KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-GalNAc   | 4                | 4,20                                                      | 16,8                                           |
| KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-Glycolyl | 3                | 4,48                                                      | 13,5                                           |
| KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-Formyl   | 3                | 4,68                                                      | 14,0                                           |
| KLH-(STP) <sub>5</sub> -Propionyl  | 3                | 4,78                                                      | 14,3                                           |
| KLH-(STP) <sub>5</sub> AG-AzidoAc  | 3                | 4,34                                                      | 13,0                                           |

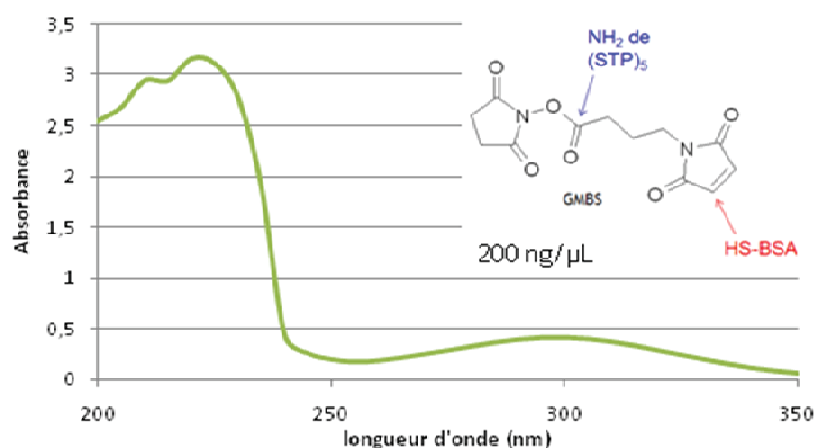
**Tableau 49.** Evaluation des quantités de produits injectées aux souris.

### II.2.2 Conjugaison des glycopeptides sur SAB

Un couplage des glycopeptides sur la SAB est également réalisé. Ces produits sont destinés à être déposés au fond des puits lors du dosage par ELISA des antisérums de souris après injection. Seule la réponse immune dirigée contre les glycoprotéines est dosée ainsi les produits déposés sont couplés à une protéine porteuse différente et en utilisant aussi une autre molécule de couplage. Les anticorps dirigés contre la KLH et contre la molécule de couplage ne sont alors pas dosés.

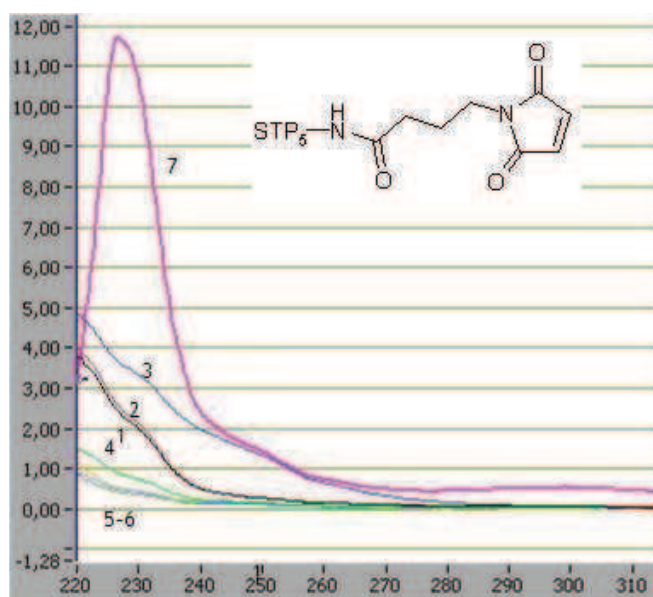
## Résultats et discussion

Le couplage de (STP)<sub>5</sub>AG glycosylé ou non sur la SAB se fait à l'aide d'une molécule de couplage : l'ester de N-[γ-Maleimidobutyryloxy]succinimide (GMBS) (figure 50).



D'après le spectre d'absorbance, le GMBS présente un pic à 230 nm et un pic à 300 nm correspondant respectivement à l'ester de N-hydroxysuccinimide et au groupe maléimide. Le groupement ester de N-hydroxysuccinimide est sensible aux substitutions nucléophiles. Il peut donc être facilement attaqué par le groupe amine en N-ter de (STP)<sub>5</sub>. Le groupement maléimide est lui sensible aux SH- pour former une liaison thioéther. Il peut donc se former de telles liaisons entre le GMBS et les soufres présents sur la SAB.

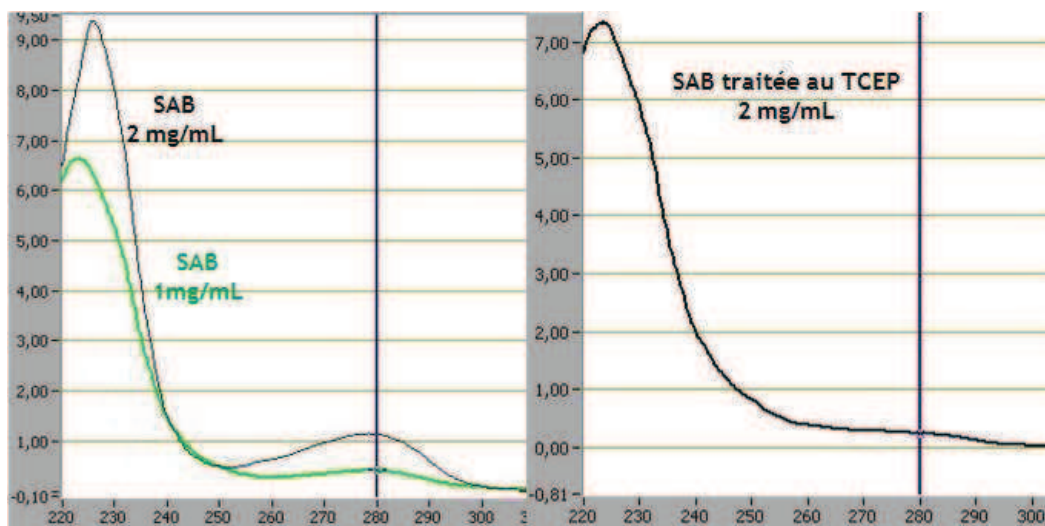
Dans un premier temps, le (STP)<sub>5</sub> glycosylé ou non est incubé une heure avec le GMBS. L'excès de GMBS est éliminé par gel filtration (figure 51).



## Résultats et discussion

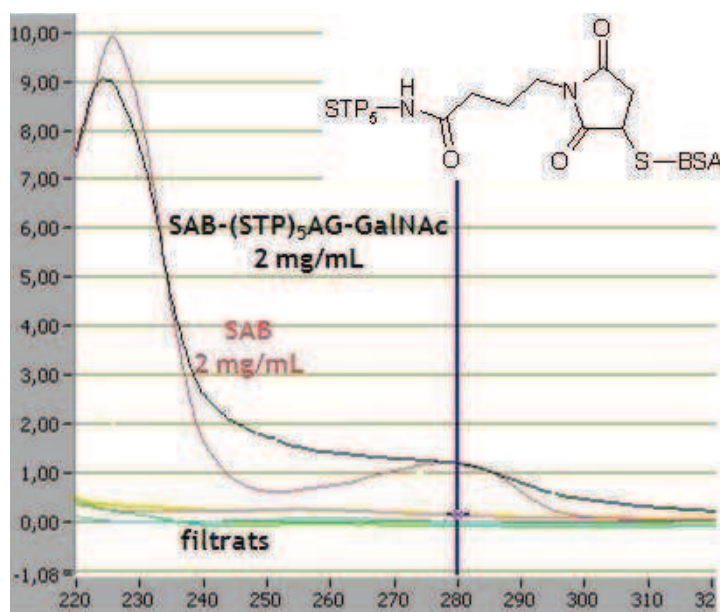
Le spectre du produit de couplage de  $(STP)_5AG$  (glycosylé ou non) avec GMBS présente un pic vers 230 nm ce qui montre l'efficacité du couplage. La fraction 7 contient le GMBS en excès.

Avant le couplage, la SAB est traitée au TCEP afin de couper les ponts disulfures et de libérer le plus grand nombre de sites -SH au niveau de la protéine (figure 52).



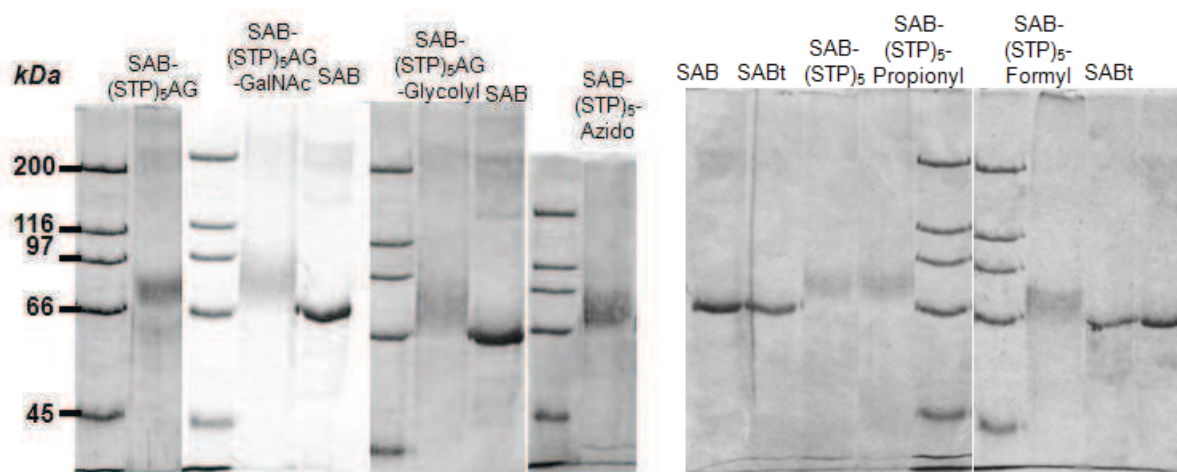
**Figure 52.** Spectre d'absorbance entre 220 et 300 nm de la SAB avant et après traitement au TCEP.

La SAB traitée est ensuite mise en présence du  $(STP)_5GMBS$  pour la nuit à 4°C. Après réaction, le produit est purifié par dialyse sur membrane de porosité 10 kDa afin d'éliminer le  $STP_5GMBS$  en excès (figure 53).



**Figure 54.** Spectre d'absorbance entre 220 et 320 nm de SAB-( $STP$ )<sub>5</sub>AG-GalNAc et des filtrats après passage sur membrane de porosité 10 kDa.

La réaction de couplage est vérifiée par migration sur gel SDS-PAGE (figure 55).



**Figure 55.** Gel SDS PAGE (7 %) des différents  $(STP)_5SAB$  en comparaison avec la SAB et la SAB traitée au TCEP (SABt).

La quantité de produit couplé sur la SAB peut être estimée d'après la distance de migration sur le gel. Pour cela on mesure la distance relative des différents marqueurs de taille avec le front de migration (distance de migration de la protéine sur distance de migration du colorant). Cette distance est représentée sur un graphique en fonction du logarithme de la masse des marqueurs de taille. La droite obtenue permet de déterminer la masse des produits d'après leur distance relative de migration (tableau 19).

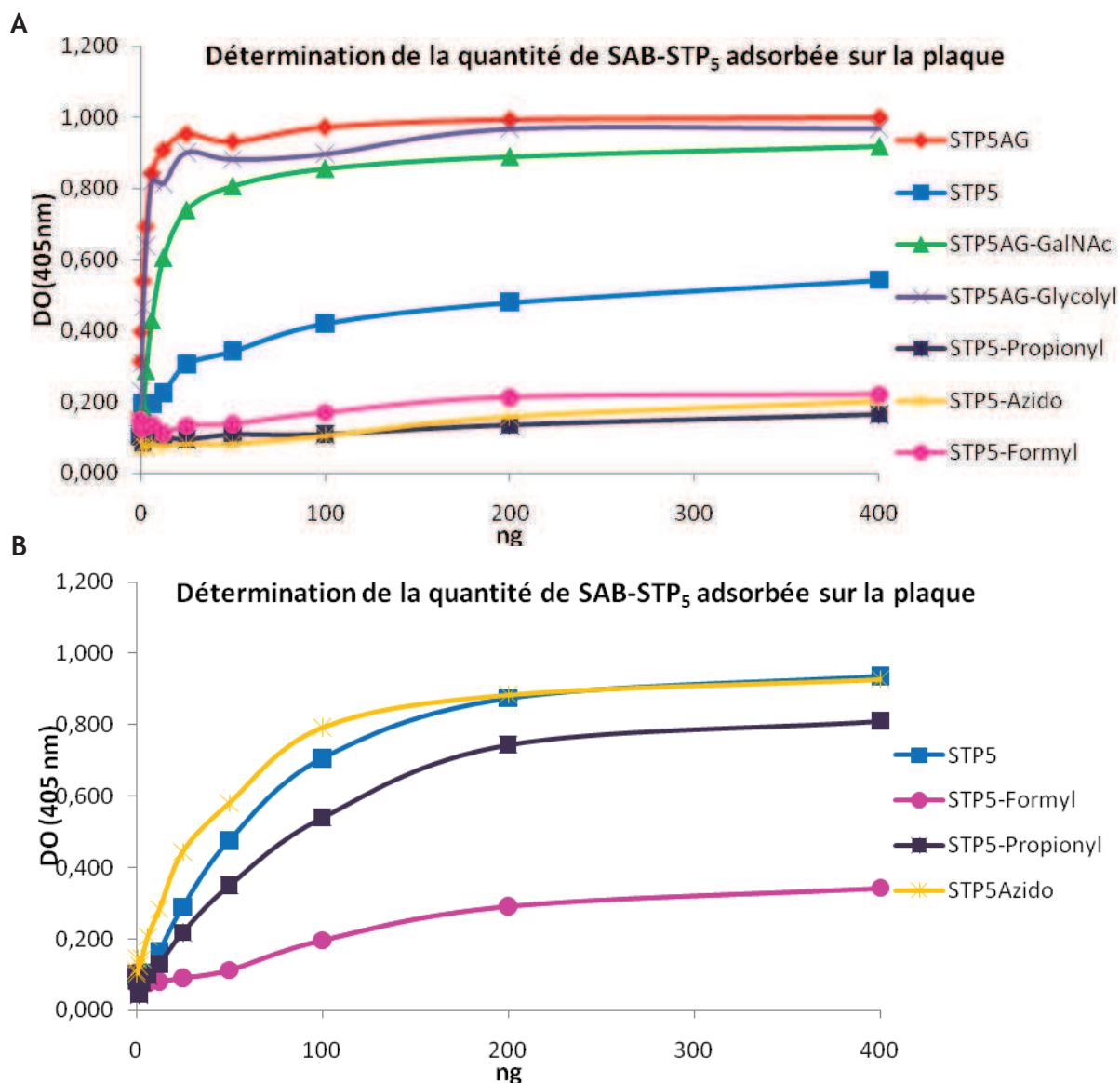
| Produit                                              | SAB-(STP) <sub>5</sub> AG | SAB-(STP) <sub>5</sub> AG-GalNAc | SAB-(STP) <sub>5</sub> AG-Glycolyl | SAB-STP <sub>5</sub> | SAB-STP <sub>5</sub> -Formyl | SAB-STP <sub>5</sub> -AzidoAc | SAB-STP <sub>5</sub> -Propionyl |
|------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Masse apparente calculée d'après le gel en SDS (kDa) | 76-92                     | 77-99                            | 78-97                              | 84-95                | 78-90                        | 76-101                        | 85-98                           |
| Masse des adduits - 66,4 kDa, MW de la SAB           | 9-26                      | 10-32                            | 12-31                              | 17-29                | 11-24                        | 10-34                         | 19-32                           |
| Masse moyenne des STP <sub>5</sub> (kDa)             | 1,57                      | 2,38                             | 2,23                               | 1,46                 | 2,01                         | 2,18                          | 2,10                            |
| Nbre de sucres par STP <sub>5</sub>                  | 0                         | 4                                | 3                                  | 0                    | 3                            | 3                             | 3                               |
| Nbre d'équivalents de STP <sub>5</sub> par SAB       | 6-16                      | 4-14                             | 5-14                               | 12-20                | 6-12                         | 5-16                          | 9-15                            |
| Nbre d'équivalents de sucres par SAB                 | 0                         | 18-54                            | 16-42                              | 0                    | 17-35                        | 14-47                         | 27-45                           |

**Tableau 19.** Estimation du rendement de couplage des différents (STP)<sub>5</sub> sur la SAB.

Même si cette méthode de calcul reste très approximative, ces résultats montrent que les rendements de couplage sur la SAB sont similaires. Le nombre d'équivalents de peptides et de sucres est similaire quelque soit l'analogue. Ainsi lors des tests ELISA, on peut admettre que pour une quantité de SAB donnée, on aura les mêmes quantités d'analogues déposées entre les différents produits. La quantité optimale à déposer pour les tests ELISA a été déterminée pour chaque analogue (voir paragraphe suivant).

### II.2.3 Evaluation de la quantité de produit à déposer sur plaques ELISA

La concentration en SAB-STP<sub>5</sub> a été évaluée par quantification sur gel d'électrophorèse après coloration au bleu de Coomassie. Des quantités croissantes de SAB-STP<sub>5</sub> sont déposées au fond des puits et révélées par. un antisérum (dilué 1/2000) d'une souris ayant reçu des injections des KLH-(STP)<sub>5</sub>AG suivi d'une solution d'anticorps anti IgG de souris couplé à la peroxydase. La révélation colorimétrique du substrat de la peroxydase permet d'évaluer la quantité maximale des SAB-STP<sub>5</sub> pouvant être adsorbée sur les plaques ELISA (figure 56).



**Figure 56.** Evaluation de la quantité maximale des SAB-STP<sub>5</sub> pouvant être adsorbée sur la plaque. Les différents produits de type SAB-STP<sub>5</sub> sont déposés à différentes quantités selon le poids de SAB (ng). Antisérums de souris 1/2000 (anti-STP<sub>5</sub>AG pour A et anti-STP<sub>5</sub> pour B), anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000.

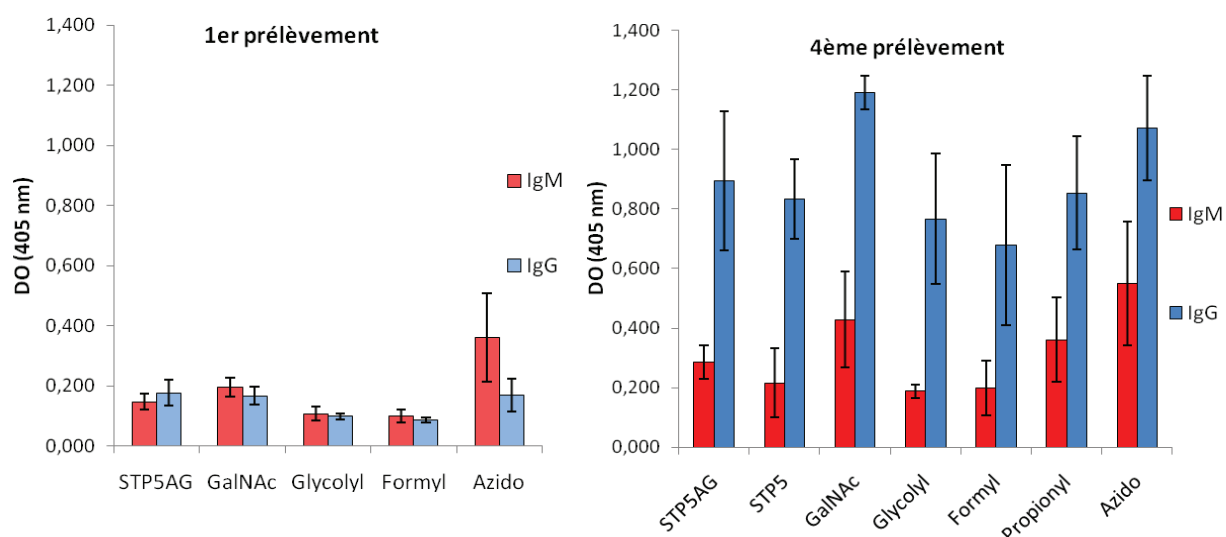
Comme nous avons du au cours des diverses séries d'expériences utiliser soit un peptide de séquence STP<sub>5</sub>AG, soit un peptide de séquence STP<sub>5</sub>, les 2 types de peptides ont été déposés au fond des puits. Dans le cas où le sérum utilisé pour la quantification des "SAB-STP<sub>5</sub>" est celui obtenu après injection de KLH-STP<sub>5</sub>AG, la réponse est plus faible pour les composés SAB-STP<sub>5</sub> (voir plus loin). Aussi pour vérifier la quantification des STP<sub>5</sub>, le test ELISA est reproduit mais cette fois ci avec un antisérums de souris ayant reçu du KLH(STP)<sub>5</sub>. Pour les tests suivants, une quantité de 100 ng pour les divers produits a été choisie. Cent ng est un bon compromis entre la quantité de produit absorbé et la quantité de produit dont nous disposons pour faire tous les tests.

## Résultats et discussion

Des ELISA identiques mais avec un anti-SAB comme anticorps primaire ont également été réalisés (non montré). Pour de la SAB pure, le maximum d'adsorption est atteint pour 50 ng de SAB, ce qui est donc une quantité du même ordre que celle déterminée précédemment et valide notre estimation par gel d'électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie.

### II.2.4 Evaluation immunologique des glycoconjugués

Les sérums ont été dosés pour leur teneur en immunoglobulines IgG et IgM. En effet ces 2 immunoglobulines sont les effecteurs de l'immunité humorale. En général cette réponse immune est caractérisée par une production préalable d'IgM suivie par une production plus importante d'IgG. Le taux d'IgG et d'IgM a été dosé sur différents sérums vis à vis de l'épitope glycopeptidique (figure 57).



**Figure 57.** Résultats du dosage des IgG et IgM des premier et quatrième prélèvements des souris injectées avec les différents KLH-(STP)<sub>5</sub>. Au fond des puits 100 ng de SAB-(STP)<sub>5</sub>AG et SAB-(STP)<sub>5</sub>AG-GalNAc sont déposés. Antisérums de souris 1/500, anti-IgG ou IgM de souris couplés à la peroxydase 1/3000.

Les produits testés sont bien immunogènes. Entre les prélèvements 1 et 4, une augmentation de la production d'IgM et d'IgG est observée. Au 1<sup>er</sup> prélèvement la réponse IgG/IgM est quasiment équivalente voire légèrement supérieure dans le cas des IgM. La réponse en IgG devient nettement la plus importante au 4<sup>ème</sup> prélèvement. Pour tous les produits, il est donc observé une réponse immune de type humorale.

## Résultats et discussion

Cependant la réponse immune semble identique entre les différents produits d'injection. Afin de mieux caractériser les anticorps produits, chaque sérum a été utilisé de façon croisée sur tous les produits "SAB-STP<sub>5</sub>" (figure 58).

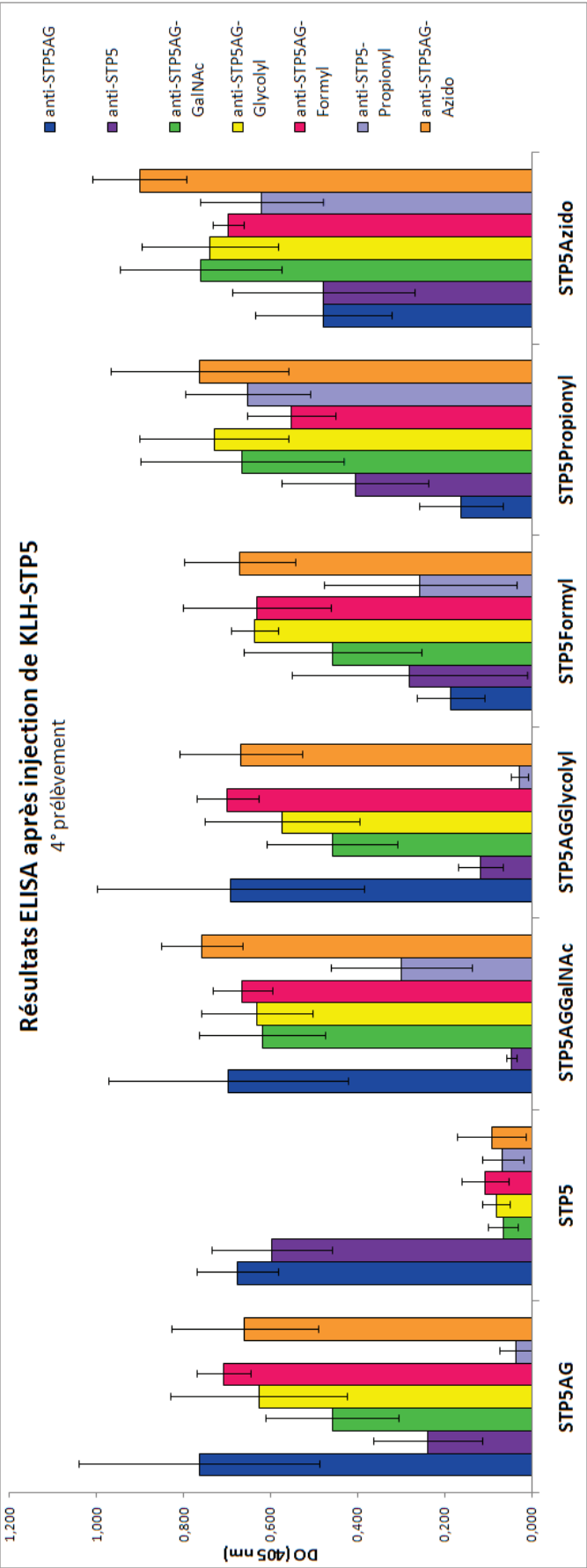


Figure 58. Résultats des tests ELISA réalisés sur les sérums des souris ayant reçu des injections de KLH-(STP)<sub>5</sub> glycosylés ou non. Au fond des puits, 100 ng des « SAB-STP<sub>5</sub> » ou « SAB-STP<sub>5</sub>AG » sont déposés. Antisérums de souris 1/2000, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000. Moyenne sur 5 souris.

Une première observation est que les résultats sont variables d'une souris à une autre d'où des écart-types importants dans certains cas. Deuxièmement, tous les sérums présentent des anticorps dirigés contre l'épitope correspondant à celui de l'injection.

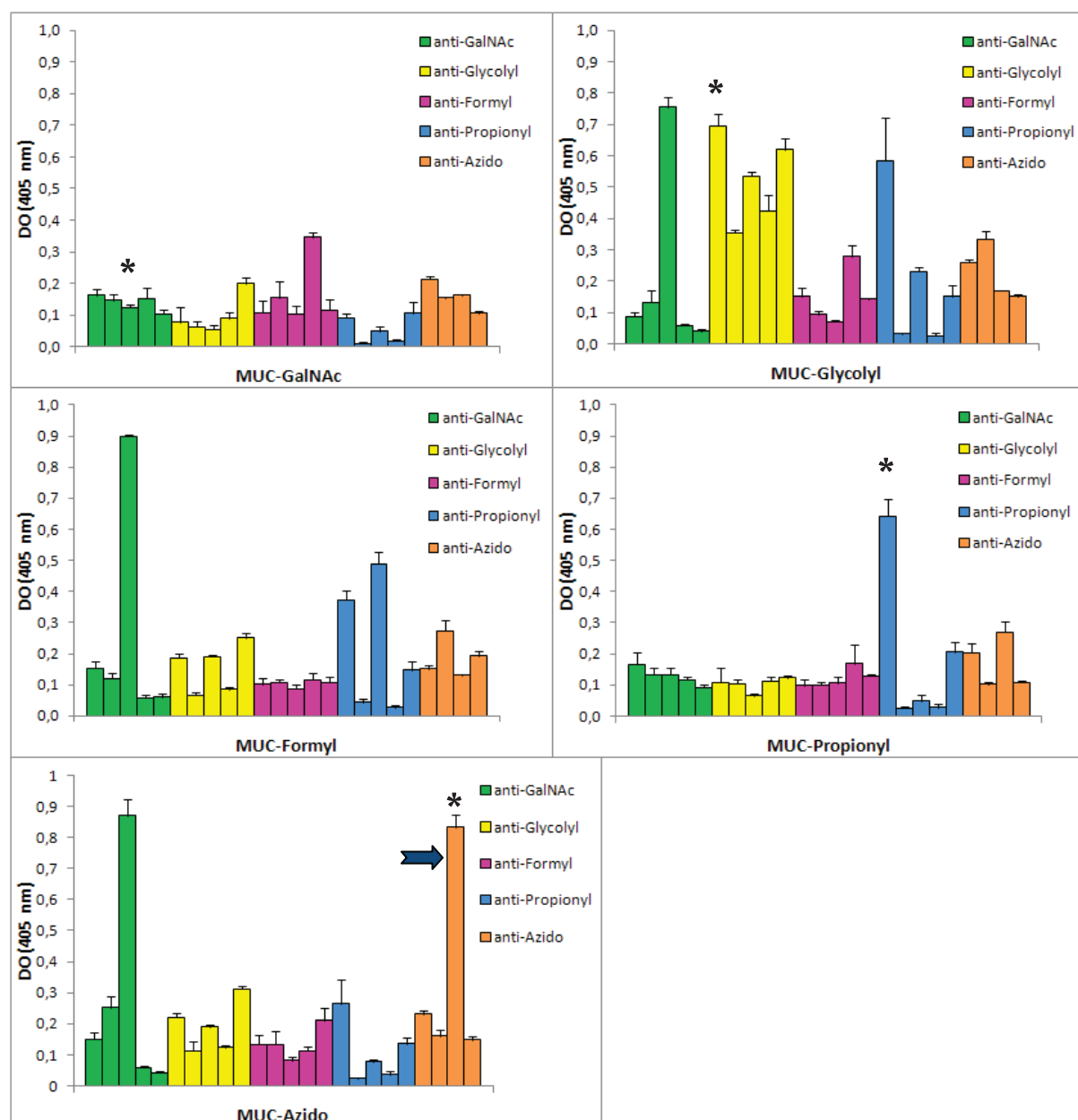
Nous avons commencé toutes ces expériences avec un lot de peptide (STP)<sub>5</sub>AG et après épuisement de ce lot, nous avons continué avec le peptide STP<sub>5</sub>, pensant alors qu'il n'y aurait pas de grosse différence de réponse immune. Cependant une différence de réponse est observée selon le produit déposé dans les puits dans le cas des sérums des souris ayant reçu des injections de KLH-(STP)<sub>5</sub>AG ou de KLH-(STP)<sub>5</sub>. Dans le cas des anti (STP)<sub>5</sub>AG, les anticorps présents reconnaissent mieux les produits glycosylés sur du (STP)<sub>5</sub>AG que ceux sur du (STP)<sub>5</sub>. On peut donc supposer que les anticorps de ces sérums sont spécifiques de la partie AG de (STP)<sub>5</sub>. Les sérums des souris ayant reçu des injections de KLH-(STP)<sub>5</sub>AG glycosylés possèdent des anticorps qui reconnaissent tous les produits glycosylés déposés dans les puits quelque soit le sucre présenté. Cette observation suggère que les anticorps produits ne sont pas spécifiques du sucre. Néanmoins ces sérums se lient sur le (STP)<sub>5</sub>AG donc ils sont spécifiques du peptide mais en même temps ils ne reconnaissent pas le peptide sans la partie AG. Pour conclure, toutes ces observations laissent penser que ces sérums possèdent des anticorps capables de reconnaître (STP)<sub>5</sub> ainsi que sa partie AG. Cependant ils se lient aussi aux peptides glycosylés sans partie AG donc le sucre doit également participer à la reconnaissance anticorps-antigène. La réponse ne semble pourtant pas être influencée par la partie modifiée du sucre. En effet les anti-(STP)<sub>5</sub>AG- GalNAc, Glycolyl, Formyl et Azido reconnaissent de façon semblable tous les produits SAB-(STP)<sub>5</sub> glycosylés. La réponse immune n'est donc pas spécifique du sucre.

Même couplés à la KLH, les glycopeptides injectés ne donnent pas de réponse immune spécifique du sucre. Les anticorps obtenus reconnaissent de façon complexe les produits déposés pour leur titration. En effet cette reconnaissance fait intervenir différentes parties du substrat : la partie peptidique composée de (STP)<sub>5</sub> et de la partie AG ainsi que le sucre. Ces résultats pourraient s'expliquer par la densité d'épitopes par KLH ainsi que l'orientation de la conjugaison. En effet il a été montré dans différentes études que ces deux paramètres pouvaient intervenir dans le type de réponse immune. De manière générale, plus le taux de couplage est élevé et plus les titres d'anticorps seront élevés. Ainsi l'équipe de Livingston a injecté 2 séries de KLH sur laquelle est couplée une structure en cluster d'antigène Tn. La différence entre ces 2 séries est le rapport de couplage (201:1 et 648:1). Avec un meilleur taux de couplage, les titres d'anticorps sont plus élevés (Kagan *et al.*, 2005). De plus des glycopeptides conjugués à une protéine porteuse à une faible densité conduisent à une réponse immune plus spécifique de la molécule (Li *et al.*, 2010). Ainsi après injection de glycopeptide portant l'antigène Tn, les anticorps produits se lient

## Résultats et discussion

avec le glycopeptide mais pas avec l'antigène Tn seul ou la GalNAc seule dans le cas où le glycopeptide injecté a été fixé avec une faible densité à la protéine porteuse. Si nos produits sont couplés à une trop faible densité cela expliquerait que les anticorps produits sont spécifiques de l'antigène en entier c'est-à-dire l'ensemble (STP)<sub>5</sub>AG + sucre sans pour autant reconnaître le sucre seul. La KLH présente 156 lysines sur lesquelles sont capables d'être fixés les glycopeptides. Or les produits injectés possèdent environ 60 peptides/KLH. Ce rapport pourrait être amélioré en augmentant le rapport peptide/KLH introduit lors de la réaction de couplage.

Même si les anticorps produits ne semblent pas être spécifiques des sucres, ceux-ci ont quand même été testés sur des MUC glycosylés. Le seul épitope sur lequel peuvent se lier les anticorps est alors le sucre (figure 59).



**Figure 59.** Résultats des tests ELISA réalisés sur les sérums des souris ayant reçu des injections de KLH-(STP)<sub>5</sub> glycosylés en déposant au fond des puits différents MUC glycosylés (100 ng). Antisérums de souris 1/100, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/3000. \* antisérums testés.

Ces résultats sont préliminaires et nécessiteraient des expériences supplémentaires pour pouvoir être interprétés correctement. Par exemple, un anti-propionyl réagit contre du MUC-glycolyl alors que précédemment il n'a pas réagi sur de la SAB-(STP)<sub>5</sub>AG-glycolyl. Cette réactivité est probablement un artéfact. De même pour l'anti-GalNAc qui réagit sur des MUC-glycolyl, formyl et azidoacétyl mais pas sur le MUC-GalNAc ce qui laisse penser qu'il n'y a pas d'anti-sucres dans ce cas. Les antisérums montrant une réactivité ont tout de même été testés sur des cellules CHO ldID cultivées en présence des analogues (voir partie

suivante). Seul l'anti-azidoacétyl ( ➡ ) a réagi sur les cellules démontrant que dans cet antisérum il y a bien des anti-sucres.

Il semble donc possible d'obtenir des anticorps dirigés vis-à-vis des sucres avec cette méthode. Néanmoins très peu de souris possèdent ces anticorps et la réponse obtenue est faible avec pourtant une faible dilution des antisérums. Encore une fois, avec plus de produit injecté et un meilleur taux de couplage de la KLH il serait possible d'améliorer ces résultats.

Une solution pour améliorer la réponse immune consisterait également à coupler les analogues directement sur la KLH. Ce type de couplage se réalise de façon chimique mais est souvent plus complexe car il nécessite plusieurs étapes de réaction notamment de protection et de déprotection des sucres. Cependant, par cette méthode les sucres peuvent être greffés avec une très grande densité et présentés d'une façon différente de ce qui est obtenu avec un transfert enzymatique, et cela peut avoir une influence sur la réponse immune. En effet le groupement modifiant la GalNAc peut être présenté différemment au système immunitaire et donc induire plus d'anticorps spécifiques de la partie modifiée de l'analogue.

Dans notre étude, le peptide STP<sub>5</sub>AG possède une séquence différente de MUC mais pas sans homologie (motif ST, motif PA communs). Nous avons vu que ce peptide était immunogène et avons donc dosé dans un premier temps, sur la SAB-(STP)<sub>5</sub>AG, les anti-(STP)<sub>5</sub>AG en même temps que les anti-sucres. Par contre en dosant les (STP)<sub>5</sub>AG mais peut être pas de tous si l'on suppose qu'il peut y avoir une réactivité croisée contre les motifs communs aux 2 peptides MUC1 et STP<sub>5</sub>. Il faudrait donc maintenant doser les antisérums que nous avons obtenus contre d'autres structures présentant des motifs Tn (type asialo BSM ou asialo OSM) pour nous assurer de l'éventuelle présence d'anticorps anti-sucres. Mais les expériences réalisées sur les cellules apportent aussi des réponses à ces questions (voir plus loin).

Une dernière hypothèse est qu'aucun des sucres testés à part l'azidoacétyl n'a de pouvoir immunogène supérieur à celui de la GalNAc. D'autres analogues de la GalNAc pourraient être utilisés pour glycosyler des peptides. Cependant dans ce cas, la tolérance des enzymes utilisées lors de la glycosylation est un facteur limitant.

## II.3 Conclusion

La première série d'injections a été réalisée avec des MUC1 glycosylés. Dans un premier temps nous avons étudié la production d'anticorps anti-MUC. Il s'est avéré que la réponse immune vis-à-vis de cet épitope est fortement diminuée dès que le peptide

injecté est glycosylé. De plus tous les anticorps produits sont dirigés contre la partie peptidique et pas vis-à-vis des sucres. Comme nous avons utilisé pour nos expériences une seule glycosyltransférase (la ppGalNAc T1) qui ne glycosyle pas toutes les positions possibles sur la séquence peptidique du domaine hautement répété de MUC1, il serait envisageable de glycosyler MUC1 au niveau de son motif PDTR qui a été déjà décrit comme un motif immuno-dominant soit non glycosylé (Finn *et al.*, 1995) soit glycosylé (Karsten *et al.*, 2004). Ainsi nous pourrions à nouveau tester si des analogues de GaNAc fixés sur cette séquence peptidique peuvent se comporter comme de meilleurs immunogènes.

Afin d'obtenir des anticorps anti-sucre, une deuxième série d'injections a été réalisée à l'aide de peptides glycosylés couplés à une protéine porteuse, la KLH. La KLH est décrite dans la littérature comme une protéine immuno-stimulante notamment envers les sucres. La réponse immune a été étudiée en ELISA vis-à-vis de l'épitope complet, peptide et sucre. Les résultats obtenus sont complexes. En effet les anticorps produits semblent reconnaître différentes parties de l'épitope c'est-à-dire le peptide dans son domaine STP et dans sa partie AG et le sucre. De plus la réponse ne semble pas être différente d'un sucre à un autre et dans les antisérums très peu d'anticorps dirigés contre le sucre seul sont retrouvés. Cette réponse pourrait être due à une faible densité de couplage de notre peptide sur la KLH. Pour vérifier cette hypothèse, des injections avec de la KLH sur laquelle est couplé le glycopeptide avec différentes densités pourraient être réalisées. Ou sinon le couplage de sucre directement sur la KLH pourrait être plus efficace.

### III. Incorporation des analogues de la GalNAc dans les cellules

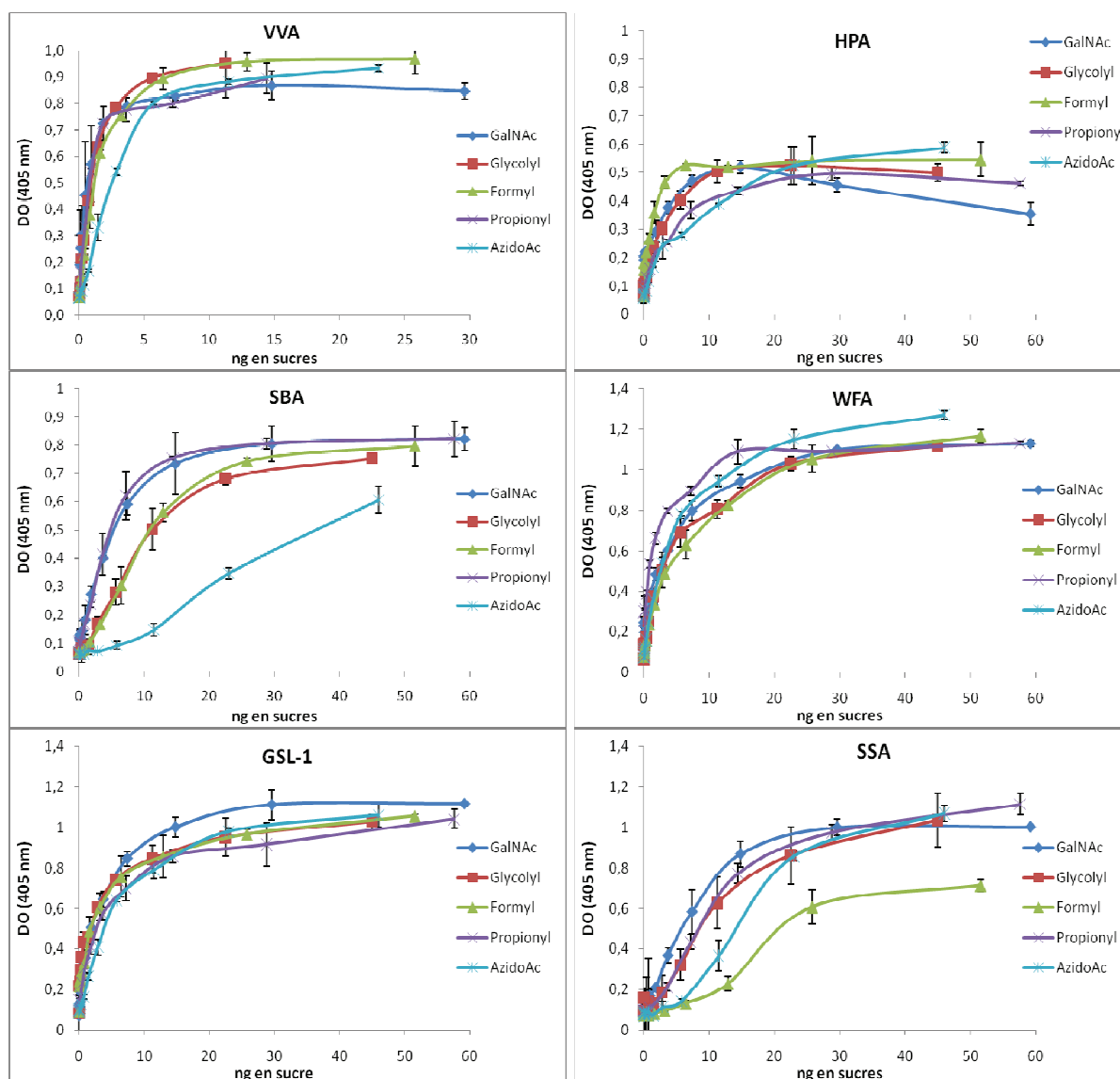
#### III.1 Tests préliminaires avec des lectines

Afin de repérer la présence des analogues à la surface des cellules, une étude préliminaire sur la reconnaissance des sucres par des lectines spécifiques de la GalNAc a été menée. Les lectines ont d'abord été utilisées en Dot-Blot sur des MUC1<sub>9</sub> glycosylés. Les quantités des MUC1<sub>9</sub> ont été estimées par gel SDS-PAGE et la quantité de sucres par MUC1<sub>9</sub> a été calculée par analyse des peptides glycosylés par spectrométrie de masse MALDI. Différentes quantités de peptides ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose afin de vérifier par Dot-blot la reconnaissance des analogues par les lectines spécifiques de GalNAc (résultats non présentés). Les lectines utilisées sont des lectines biotinylées, VVA (*Vicia villosa agglutinin*), SBA (*Soybean agglutinin*), WFA (*Wisteria floribunda agglutinin*), GSL-1 (*Griffonia simplicifolia lectin I*), HPA (*Helix pomatia agglutinin*) et SSA (*Sambucus sieboldiana agglutinin*). La biotine est reconnue par l'extravidine couplée à la phosphatase alcaline. Par réaction colorimétrique d'un substrat avec la phosphatase alcaline, on obtient une tache colorée. Toutes les lectines testées reconnaissent de façon identique les analogues présents sur les MUC.

De plus une autre lectine, PNA biotinylée, a été testée et le Dot-blot a donné cette fois un résultat négatif quelque soit l'analogue. En effet PNA est une lectine spécifique du motif GalB1-3GalNAc.

La reconnaissance des glycopeptides par ces lectines a également été observée en ELISA (figure 60). Différentes quantités de peptides ont été déposées. Les lectines utilisées sont les mêmes lectines biotinylées. La biotine est reconnue par l'extravidine couplée cette fois ci à la peroxydase.

## Résultats et discussion



**Figure 60.** Résultats des tests ELISA réalisés sur des MUC1, glycosylés par la GalNAc, la N-glycolyl, N-formyl, N-propionyl et N-azidoacétyl galactosamine avec différentes lectines. VVA (1 µg/mL), HPA (1 µg/mL), SBA (0,5 µg/mL), WFA (1 µg/mL), GSL-1 (2 µg/mL) et SSA (1,3 µg/mL). Extravidine couplée à la peroxydase, 1/5000.

D'après ces courbes, la reconnaissance des sucres par des lectines spécifiques de la GalNAc est identique pour tous les analogues à quelques exceptions près. Il semble par conséquent que les sites de reconnaissance des diverses lectines utilisées (qui sont toutes spécifiques de la GalNAc) s'accommodent parfaitement des modifications apportées aux divers analogues testés et que tous les analogues adoptent une conformation identique sur le peptide. Ces lectines ne pourront donc pas être employées pour discriminer l'incorporation des divers analogues par les cellules mais elles peuvent toutes être employées pour les repérer. Par la suite, VVA a été utilisée pour vérifier l'incorporation des sucres dans les cellules.

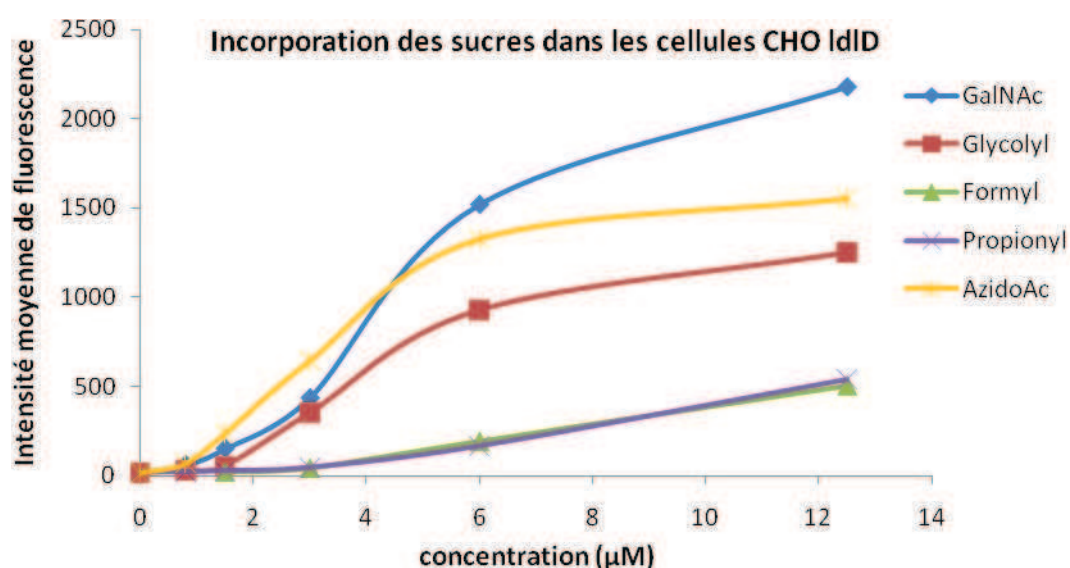
## III.2 Essais d'incorporation d'analogues de la GalNAc

L'incorporation des analogues de la GalNAc a été étudiée sur des cellules CHO IdID. Ces cellules ne présentent pas de GalNAc à leur surface mais ce défaut peut être corrigé par ajout exogène de sucre (voir introduction).

Les cellules CHO IdID sont cultivées en présence d'analogues peracétylés. En effet les sucres sous une forme peracétylée franchissent mieux la membrane cellulaire que des sucres libres. Ils sont ensuite rapidement déacétylés dans le cytosol par des estérases (Jacobs *et al.*, 2000).

### III.2.1 Evaluation de la concentration en sucres à utiliser

Les cellules CHO IdID ont été cultivées en présence de différentes concentrations en sucres. Ces cellules sont ensuite marquées avec VVA couplée à la fluorescéine (FITC) puis analysées en FACS (figure 61).

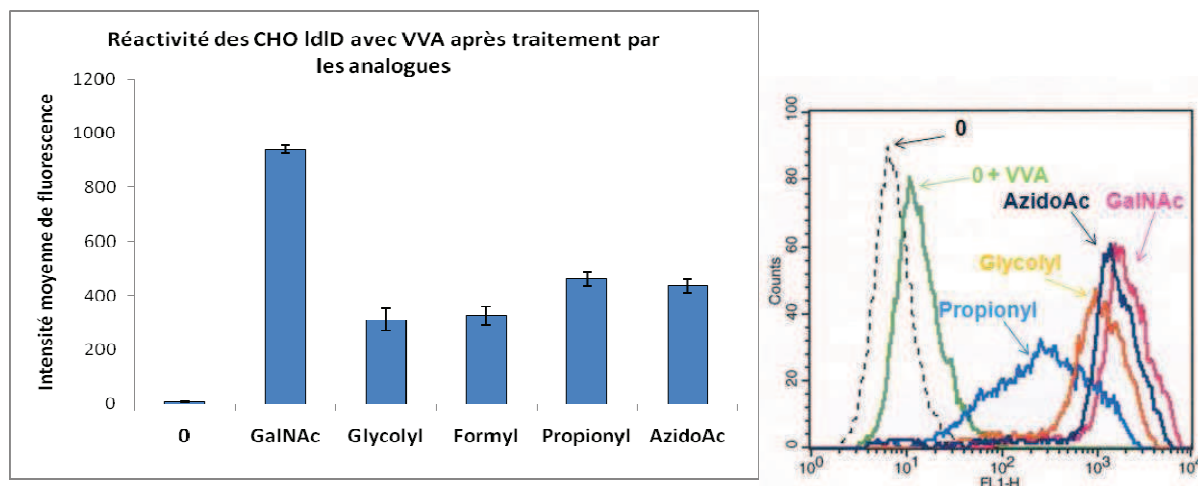


**Figure 61.** Incorporation des analogues de la GalNAc dans des cellules CHO IdID en fonction de leur concentration.

Les sucres sont bien incorporés par les cellules. Néanmoins il a été observé chez certains sucres que pour des concentrations plus élevées (50 µM) l'intensité de fluorescence diminue (résultats non montrés). Ce résultat semble indiquer qu'à partir d'une certaine concentration, les sucres deviennent cytotoxiques pour les cellules. Ainsi une concentration de 12,5 µM d'analogues semble être un bon compromis entre le taux d'incorporation, la cytotoxicité et les quantités d'analogues disponibles.

### III.2.2 Incorporation des sucres dans les cellules et synthèse de glycanes

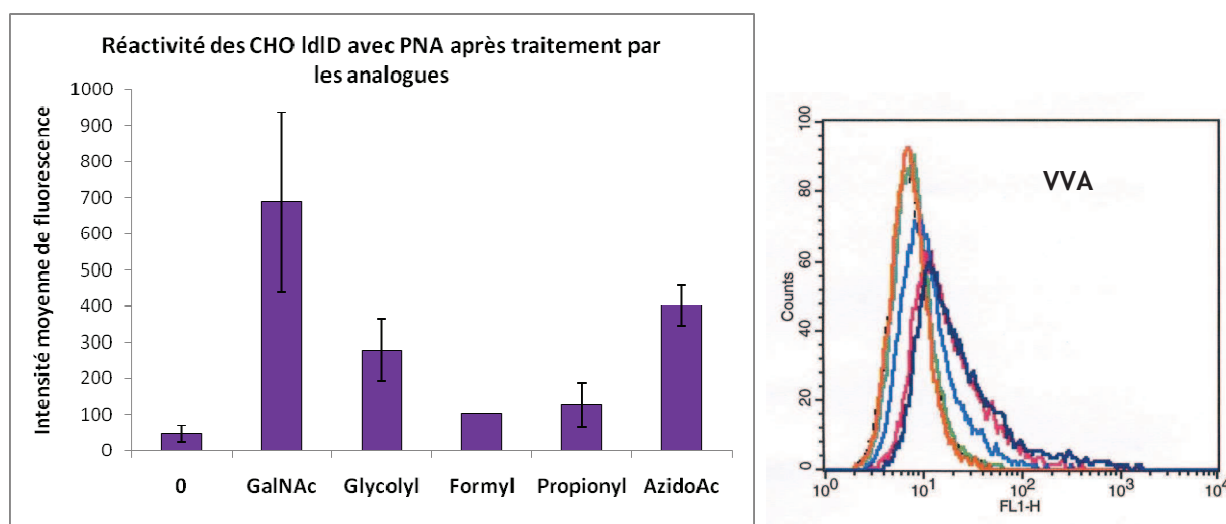
Les cellules CHO IdlD ont été cultivées en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  de sucres. Ces cellules sont ensuite marquées avec VVA couplée à la fluorescéine (FITC) puis analysées en FACS (figure 62).



**Figure 62.** Réactivité de VVA (10  $\mu\text{g/mL}$ ) sur des cellules CHO IdlD après incubation en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  de sucres. (Moyenne sur 3 expériences pour le graphe de gauche. Résultats d'une expérience pour le graphe de droite.).

La GalNAc reste le sucre le mieux incorporé dans les cellules mais les analogues sont bien incorporés également et sont donc substrats des enzymes présentes dans les cellules. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus en ELISA (figure 60). Puisque VVA reconnaît de la même manière toutes les substances glycosylées déposées dans les puits quelque soit l'analogue, la reconnaissance modulée constatée maintenant au niveau des cellules reflète probablement la différence de densité des analogues à la surface des CHO IdlD. La GalNAc est donc le sucre le mieux exprimé à la surface, suivie du glycolyl et de l'azidoacétyl qui sont marqués par VVA avec une intensité similaire (environ 60% du marquage obtenu pour GalNAc), puis enfin des formyl et propionyl qui sont nettement moins (environ 20% de l'intensité du marquage obtenu avec GalNAc) représentés à la surface des cellules.

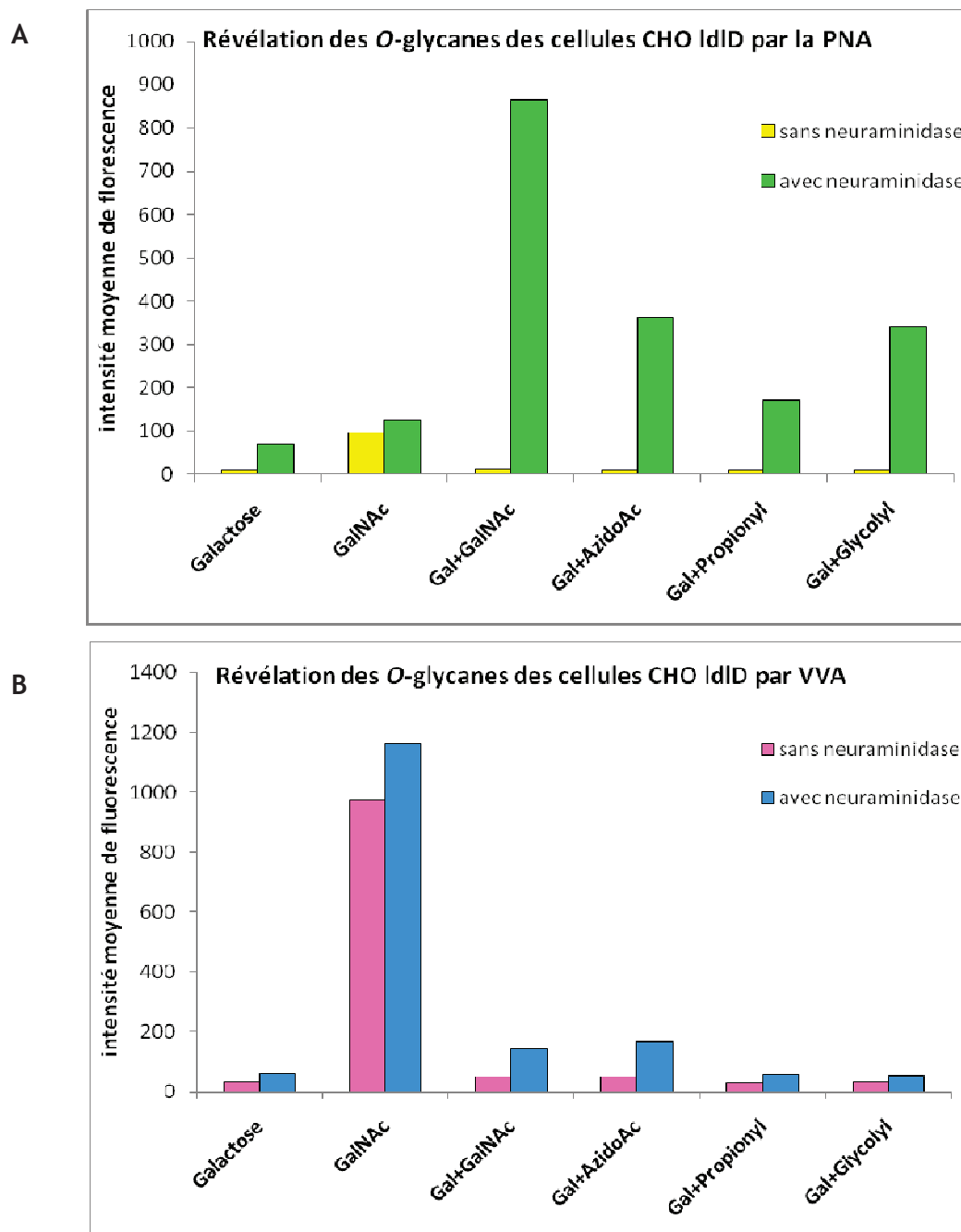
Il a ensuite été vérifié si le galactose pouvait être incorporé sur les analogues présents à la surface des cellules. Les cellules sont cultivées en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  d'analogues et de 20  $\mu\text{M}$  de galactose. Les cellules sont ensuite marquées par PNA, une lectine spécifique du motif Gal $\beta$ 1-3GalNAc, couplée à la FITC puis analysées par FACS (figure 63).



**Figure 63.** Réactivité de PNA (5  $\mu\text{g/mL}$ ) sur des cellules CHO IdID après incubation en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  de sucres et 20  $\mu\text{M}$  de galactose puis désialylation avec une sialidase de *Vibrio cholerae* (moyenne sur 3 expériences) et réactivité de VVA (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (résultats d'une expérience).

Dans ce cas également, l'intensité de fluorescence obtenue est plus forte avec la GalNAc. Néanmoins ce résultat s'explique par le fait que la GalNAc est le sucre le mieux incorporé (voir résultats avec VVA). Ainsi plus de GalNAc est présent sur les glycoprotéines et donc plus de galactose peut être fixé sur la GalNAc. Les analogues quant à eux sont aussi incorporés par les cellules et l'intensité des marquages obtenus avec PNA reflète la densité des analogues présents sur les mucines à leur surface. Il faut remarquer que les profils de marquage sont identiques pour les 2 lectines VVA et PNA pour les différents analogues ce qui conforte la conclusion précédente sur la quantité variable d'incorporation des analogues dans les cellules. Des résultats similaires avaient été obtenus lors des tests enzymatiques avec la B1-3 galactosyltransférase sur des MUC1 glycosylés. Mais l'azidoacétyl s'était avéré un moins bon substrat alors que cela ne semble pas être le cas au niveau des cellules.

Pour tous les résultats présentés précédemment, les cellules ont été soumises à un traitement par la neuraminidase avant le marquage par des lectines. La neuraminidase est une enzyme capable de retirer les acides sialiques éventuellement présents sur les analogues ou le motif Gal B1-3analogues. Une étude comparative avec et sans traitement a été réalisée afin de vérifier la présence ou non d'acide sialique sur les glycanes formés à la surface des cellules CHO IdID après incubation en présence des analogues et/ou de galactose (figure 64).



**Figure 64.** Réactivité de PNA (5  $\mu\text{g/mL}$ ) sur des cellules CHO IdID après incubation en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  de sucres et avec ou sans 20  $\mu\text{M}$  de galactose avec ou sans traitement à la neuraminidase (A). Réactivité de VVA (10  $\mu\text{g/mL}$ ) sur des cellules CHO IdID après incubation en présence de 12,5  $\mu\text{M}$  de sucres et avec ou sans 20  $\mu\text{M}$  de galactose avec ou sans traitement à la neuraminidase (B).

Dans le cas de la révélation avec PNA, une nette différence d'intensité est observée entre les cellules traitées et celles non traitées. Le traitement par la neuraminidase permet d'ôter les sucres qui recouvrent les glycanes et ils deviennent plus accessibles à la lectine. On peut donc supposer que la plupart des motifs galactose B1-3 analogue liés en

O-sur les glycoprotéines sont recouverts d'un ou deux acides sialiques. Les ST6GalNAc sont en effet capables d'utiliser comme substrat accepteur une GalNAc portée par une structure de type Gal $\beta$ 1-3GalNAc-*O*-glycoprotéine qu'elle soit sialylée ou non dans le cas de ST6GalNAc I et II (Sewell *et al.*, 2006) et sous une forme sialylée pour ST6GalNAc III, IV, V et VI (Tsuchida *et al.*, 2005).

Dans le cas de la révélation par VVA, la différence d'intensité entre les cellules traitées ou non est très faible. Néanmoins la fluorescence est légèrement plus intense pour les cellules traitées ce qui signifie que les analogues peuvent aussi partiellement être recouverts par un acide sialique ou que la désialylation de toutes la surface des cellules entraînant une nette diminution des charges, cela permet une meilleure fixation de VVA sur les GalNAc libres. Les résultats obtenus laissent cependant supposer que la sialyltransférase ST6GalNAc I est très peu active dans ces cellules.

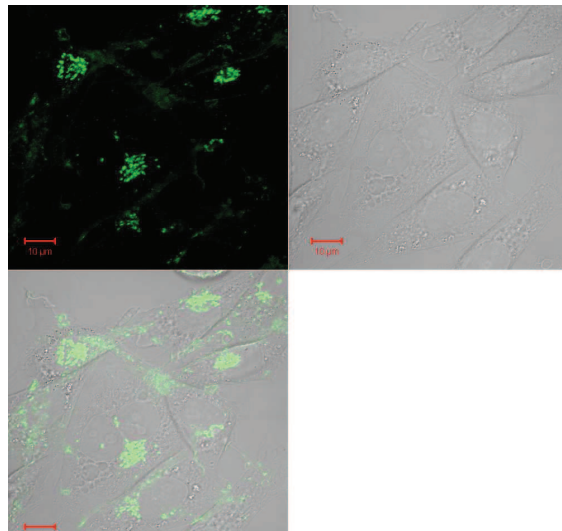
Les analogues incorporés aux glycoprotéines sont donc substrats des sialyltransférases qu'ils soient sous la forme analogue-*O*-glycoprotéine ou Gal $\beta$ 1-3-analogue-*O*-glycoprotéine. Ces résultats confirment les résultats obtenus avec les tests enzymatiques réalisés sur ST6GalNAc I.

### III.3 Observation en microscopie confocale

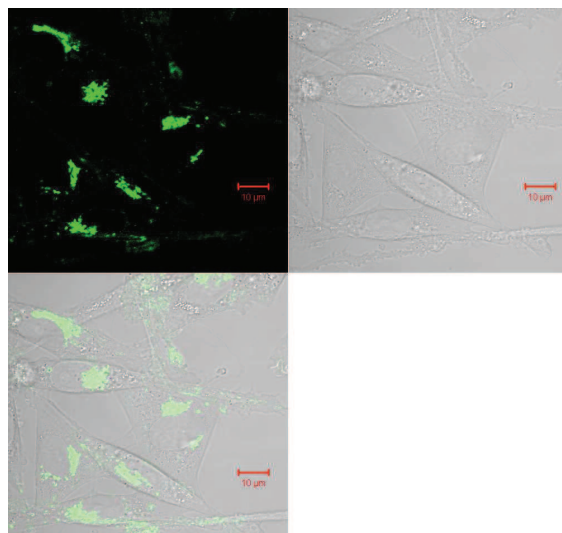
Les cellules CHO IdlD sont incubées la nuit en présence de la GalNAc ou des analogues peracétylés et avec ou sans galactose. Le lendemain, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde et traitées à la neuraminidase afin de désialyler les glycanes présents à la surface des cellules. Une première observation a été réalisée avec VVA sur les cellules cultivées en présence des sucres. Lors du marquage par VVA-FITC (vert), les cellules sont perméabilisées ou non par 0,1 % de saponine puis observées au microscope confocal (figure 65).

## Résultats et discussion

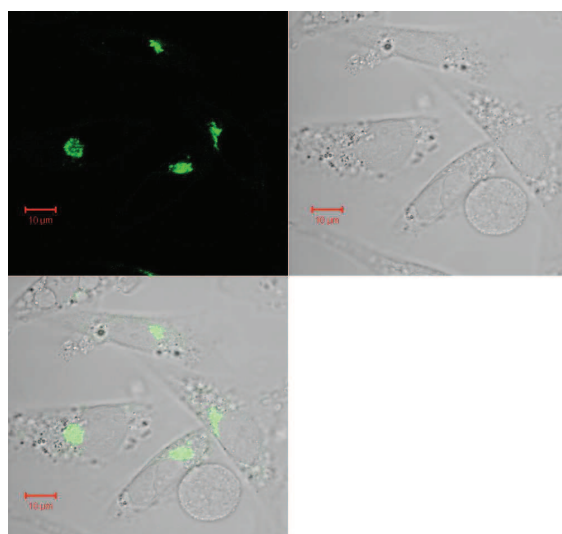
### *Avec saponine*



GalNAc

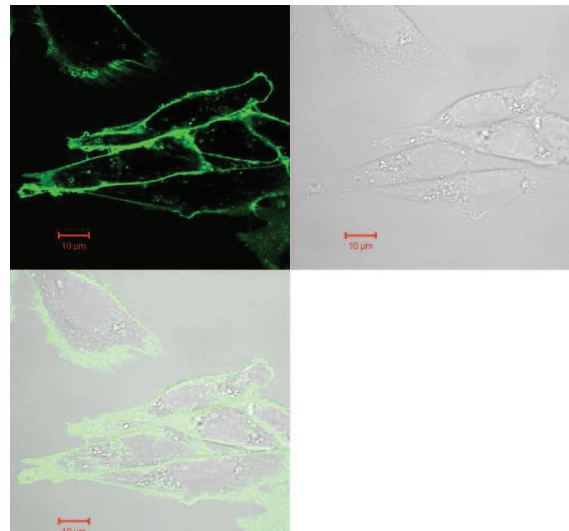


Glycolyl

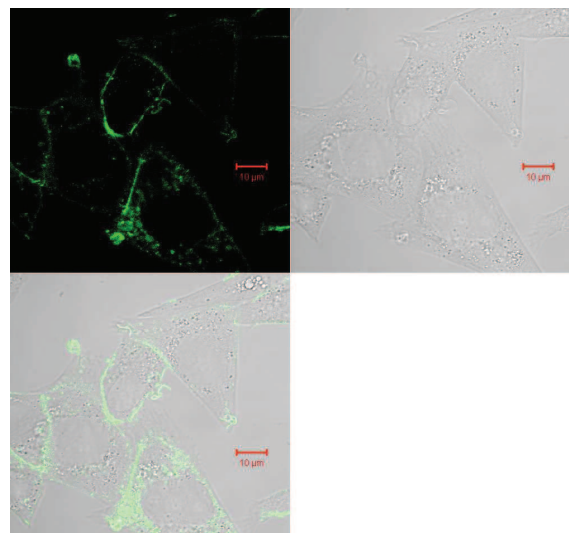


Formyl

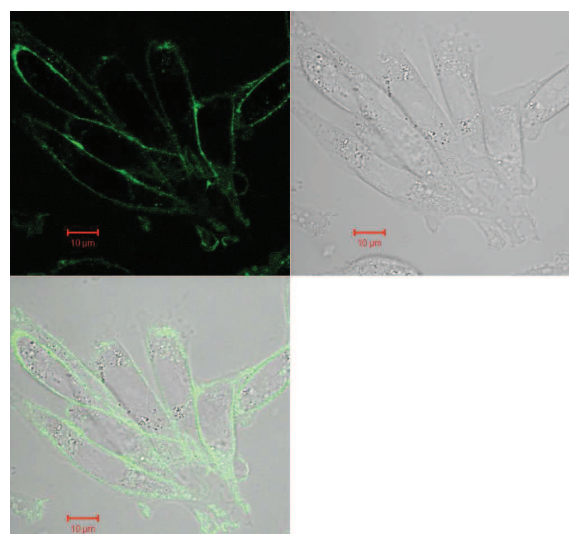
### *Sans saponine*



GalNAc

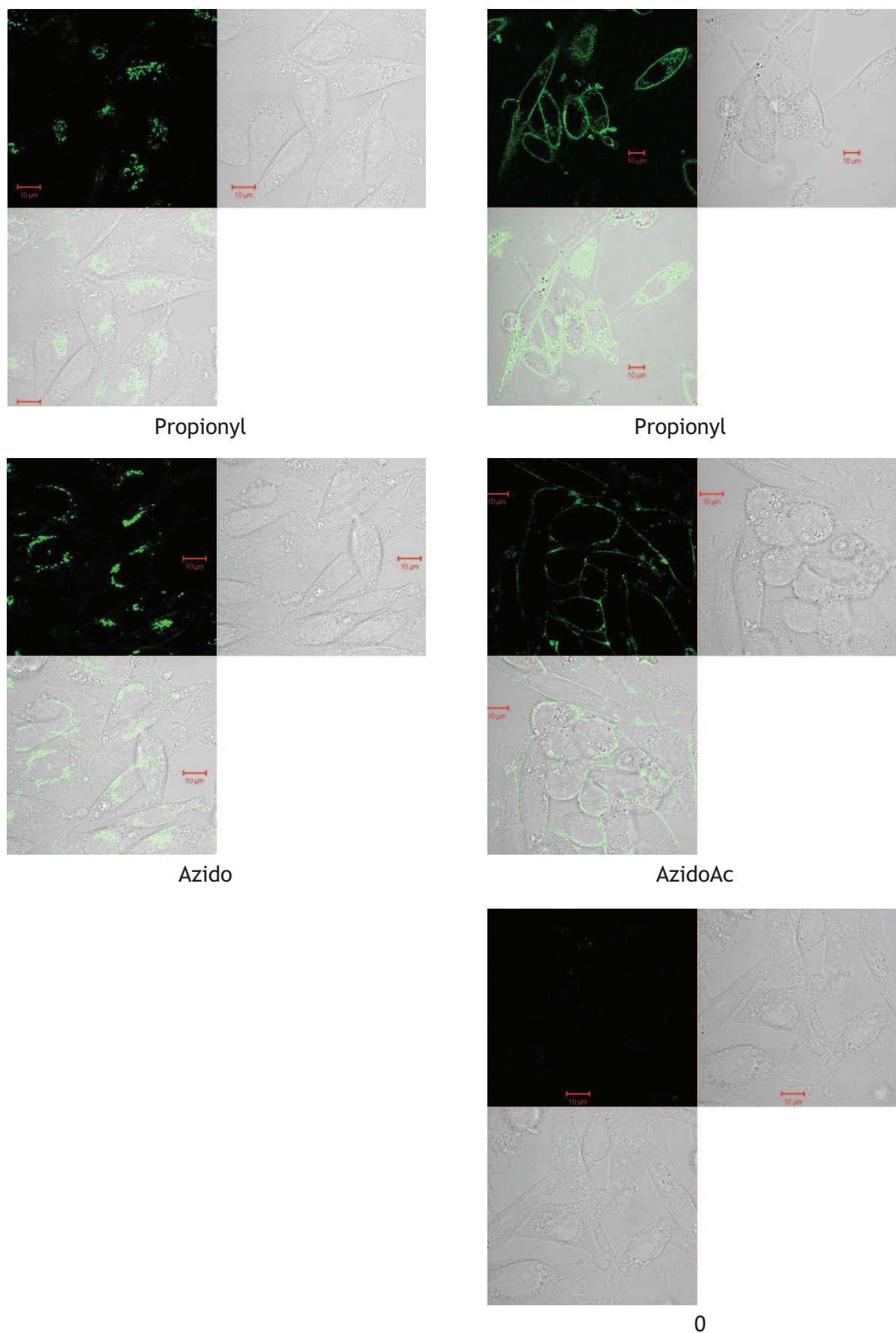


Glycolyl



Formyl

## Résultats et discussion

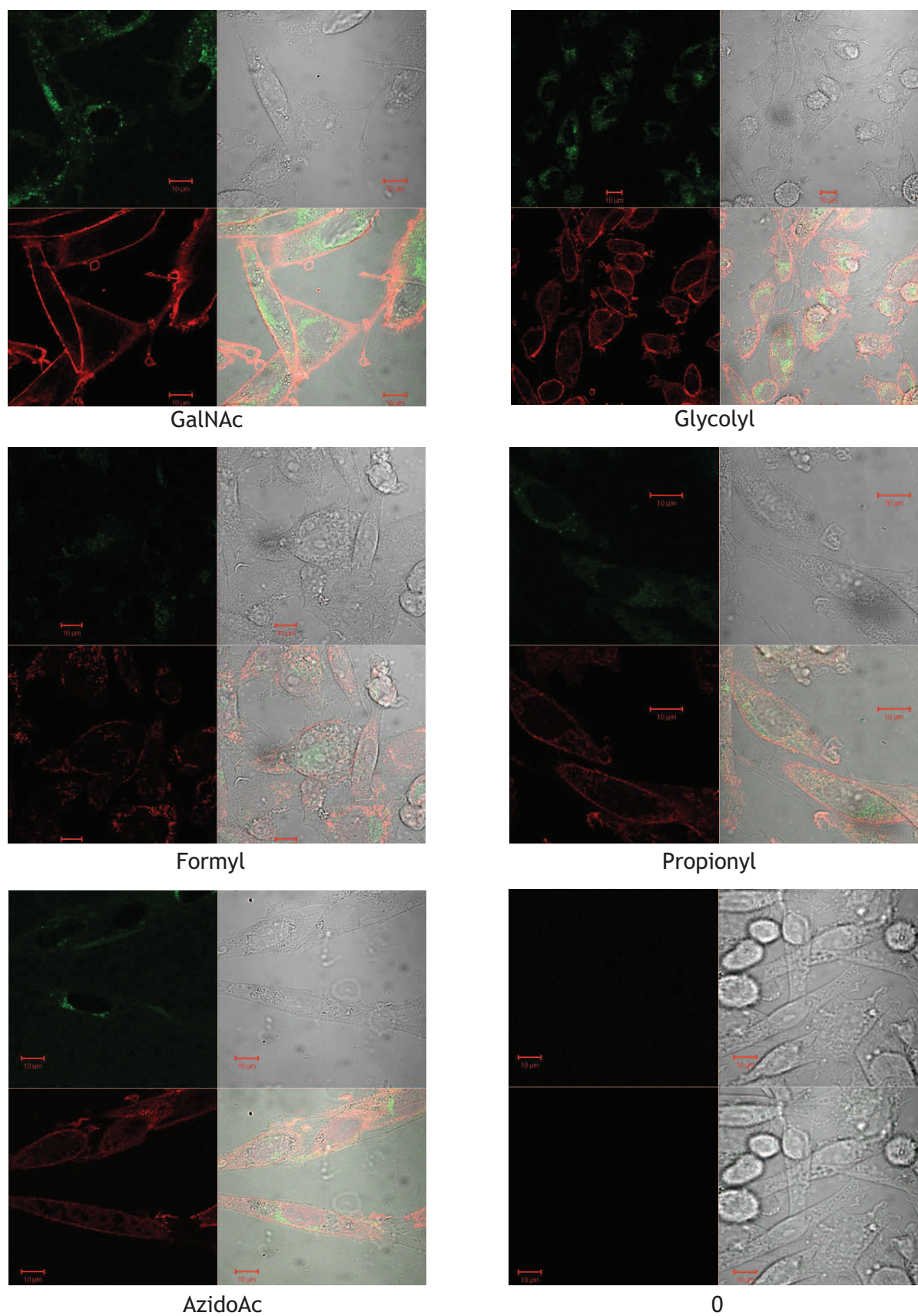


**Figure 65.** Etude par microscopie confocale (objectif 63x) des cellules CHO IdID cultivées en présence des analogues et marquées par VVA-FITC.

## Résultats et discussion

Lorsque les cellules ont été traitées par la saponine et donc que la membrane cellulaire a été perméabilisée, le marquage se situe principalement à l'intérieur des cellules notamment ce qui semble être le Golgi. En effet la formation des *O*-glycanes se situe dans l'appareil de Golgi. Un faible marquage de la membrane est également observé. Lorsque les cellules n'ont pas été traitées par la saponine, les membranes cellulaires sont clairement marquées par VVA ce qui révèle la présence de nombreux glycanes en surface également avec les analogues. Les analogues sont donc bien incorporés dans les cellules ce qui confirme les résultats obtenus en FACS.

Une deuxième observation a été réalisée avec PNA sur les cellules cultivées en présence des analogues et de galactose. Les cellules sont d'abord traitées par la neuraminidase puis marquées par PNA-biotinylée en présence de saponine. Puis après rinçage, l'Avidine-Alexa 568 est ajoutée en même temps que VVA-FITC. L'avidine se fixe sur la biotine ainsi le marquage par PNA est visible grâce au fluorochrome Alexa 568 (rouge). VVA permet de marquer les glycanes avec la GalNAc ou un des analogues seuls (vert) et PNA le motif Gal B1-3GalNAc/analogue (rouge) (figure 66).



**Figure 66.** Etude par microscopie confocale (objectif 63x) des cellules CHO IdID cultivées en présence des analogues et de galactose et marquées par VVA-FITC et PNA-biotinylée + Avidine Alexa 568.

Le marquage par PNA se situe principalement au niveau de la membrane cellulaire surtout dans le cas des sucres qui sont de bons substrats de la  $\beta$ 1,3 galactosyltransférase comme la GalNAc et le glycolyl. Pour les autres sucres, le marquage est en surface ainsi qu'à l'intérieur des cellules. L'incorporation de galactose sur le formyl est très faible ce qui confirme les résultats obtenus en FACS.

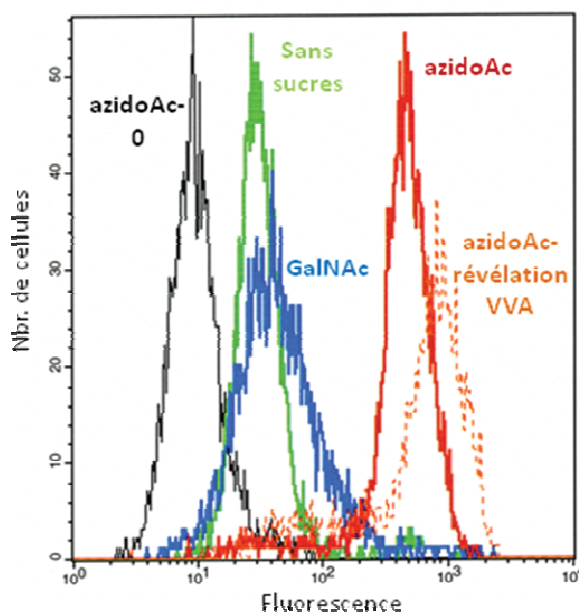
Avec VVA, le marquage est très faible et localisé à l'intérieur des cellules. Cependant l'intensité est un peu plus forte au niveau de l'appareil de Golgi où les O-glycanes sont en cours de synthèse et donc à un stade antérieur à la substitution par un galactose.

Les analyses en FACS et en microscopie confocale ont confirmé que les analogues étaient bien incorporés dans des cellules CHO ldID. De plus ces sucres une fois fixés sur des protéines sont également substrats d'autres enzymes. Ainsi sur les analogues, du galactose et des acides sialiques peuvent être ajoutés. Toute fois les cellules utilisées pour ces tests sont incapables de synthétiser de la GalNAc en raison de leur déficience en Glc/GlcNAc-4 épimérase. Il faudrait donc maintenant tester l'incorporation des analogues au sein de cellules possédant un métabolisme normal des glycanes afin de vérifier si les sucres modifiés peuvent concurrencer la GalNAc. Cependant il faut trouver au préalable un moyen de repérer ces sucres, les lectines étudiées reconnaissant toutes les analogues au même titre que la GalNAc et les injections aux souris n'ayant permis d'obtenir qu'un seul anticorps spécifique d'un des analogues. Pour pallier à ces problèmes on peut envisager la préparation d'analogues radiomarqués permettant de suivre leur incorporation dans les cellules. Cette technique implique d'effectuer la synthèse de chaque analogue en utilisant comme produit de départ la galactosamine marquée au  $^{14}\text{C}$  sur ses carbones.

### **III.4 Etudes préliminaires de la reconnaissance des sucres incorporés par les cellules**

#### **III.4.1 Reconnaissance par des antisérums**

Les antisérums issus des injections avec les produit « KLH-STP<sub>5</sub> » ont été testés sur des MUC1, glycosylés afin de vérifier la production ou non d'anti-corps anti-sucres (figure 59). Suite aux résultats obtenus, certains antisérums (un anti-GalNAc, un anti-glycolyl, un anti-propionyl et un anti-azidoAc) ont été testés en FACS sur des cellules CHO ldID cultivées en présence des sucres. La présence d'anticorps reconnaissant des sucres a été mise en évidence uniquement dans le cas de l'azidoAc (figure 67).



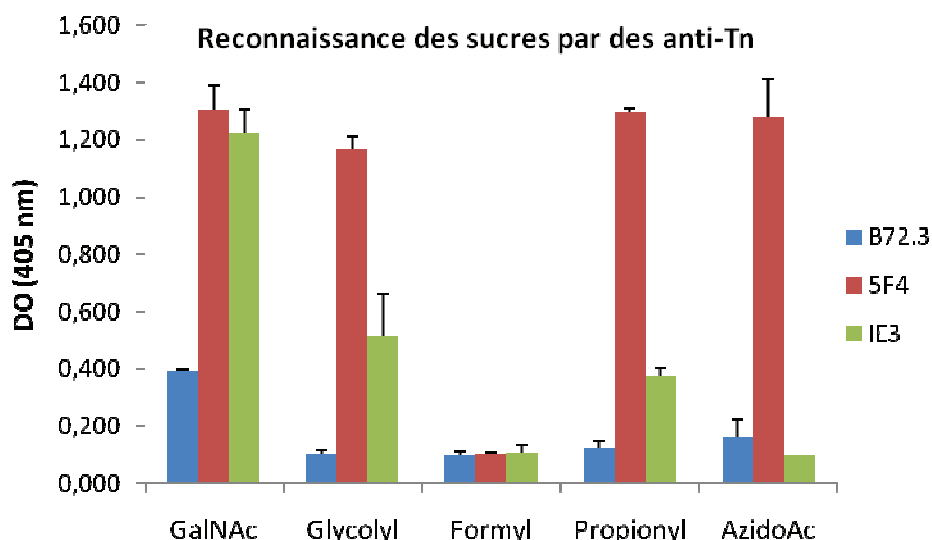
**Figure 67.** Réactivité de cellules CHO IdD cultivées en présence de  $12,5 \mu\text{M}$  d'azidoAc révélée avec l'anticorps secondaire (noir), l'antisérum anti-azidoAc (1/1000, rouge), VVA ( $10 \mu\text{g/mL}$ , orange). Révélation avec anti-azidoAc sur des cellules cultivées sans sucre (vert) ou avec de la GalNAc (bleu).

L'intensité de la fluorescence sur des cellules cultivées avec de l'azidoacétyl et révélée avec l'anti azidoacétyl est comparable à l'intensité obtenue avec VVA. Il existe donc des anticorps anti-azidoacétyl dans cet antisérum. De plus, l'intensité de fluorescence est presque nulle dans le cas de cellules cultivées avec de la GalNAc. Les anticorps sont donc spécifiques du sucre azidoacétylgalactosamine.

Il est donc possible d'obtenir des anticorps spécifiques contre les sucres en injectant des glycopeptides couplés à la KLH. D'autres injections devraient être réalisées avec des glycopeptides plus fortement glycosylés. La réponse immune est également variable d'une souris à une autre donc il est également nécessaire de multiplier le nombre de souris testés.

### III.4.2 Reconnaissance par un anticorps anti-Tn

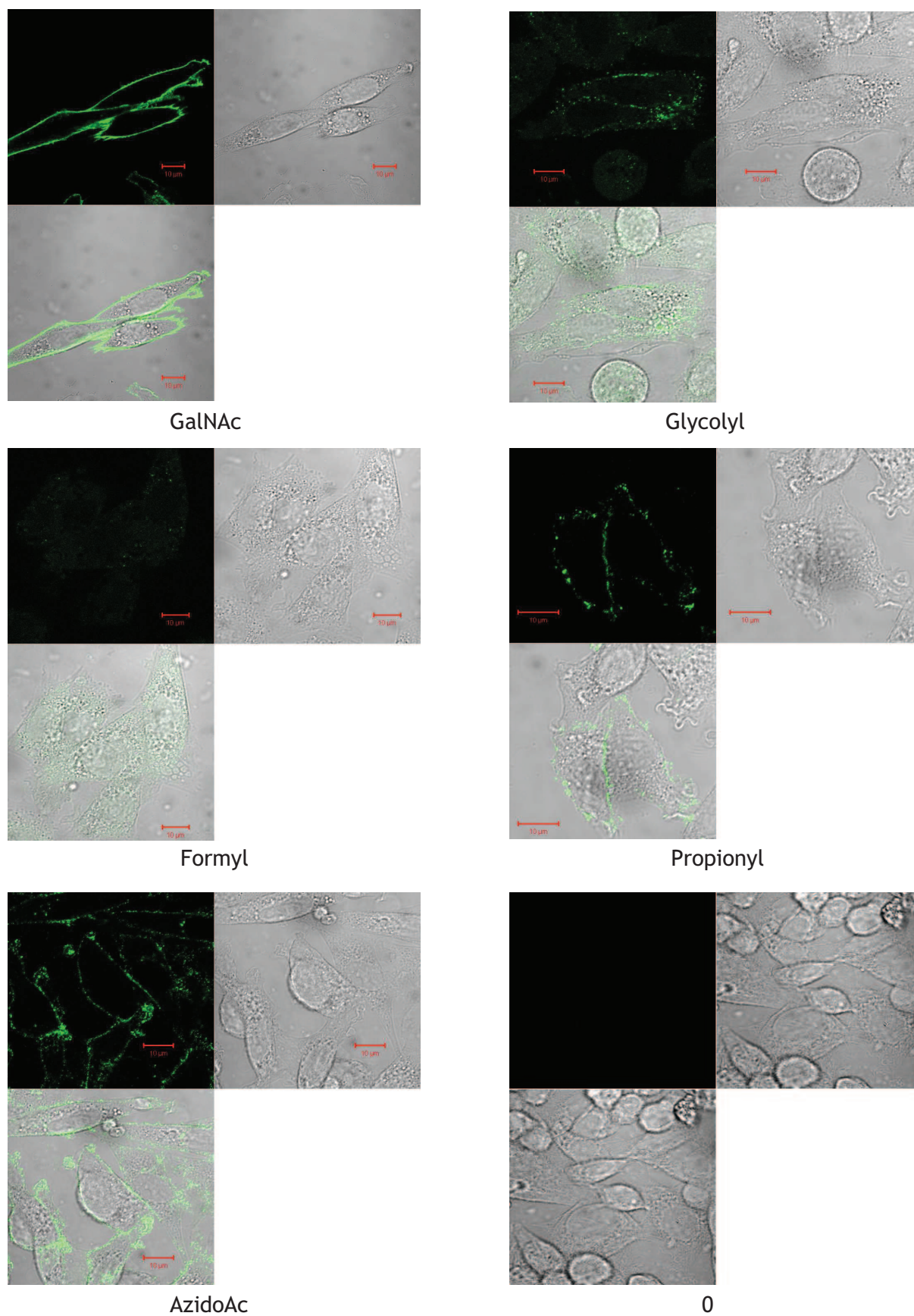
Trois milieux de culture différents contenant des anticorps anti-Tn nous ont été fournis par le Dr Ulla Mandel (Université de Copenhague, Danemark). Ces 3 anticorps ont d'abord été testés en ELISA sur des peptides MUC1, glycosylés (figure 68). IE3 et 5F4 étant des anti-Tn et B72.3 un anti-Tn et sialyl Tn.



**Figure 68.** Résultats des tests ELISA réalisés avec des anti-Tn en déposant au fond des puits différents MUC1, glycosylés (100 ng). Anti-Tn 1/8, anti-IgG de souris couplé à la peroxydase 1/1000.

Deux anti-Tn, 5F4 et IE3, reconnaissent bien la GalNAc, le troisième, qui est aussi un anti-sialyl Tn présentant une reconnaissance plus faible. Aucun des anti-Tn testés ne reconnaît le peptide glycosylé par le formyl néanmoins le 5F4 se lie très bien à tous les autres analogues. Cet anticorps a été choisi pour vérifier par microscopie confocale la présence en surface des cellules CHO IdlD des analogues incorporés. L'anti-Tn 5F4 a été révélé au moyen d'un anticorps anti souris couplé au fluorochrome FITC avant l'observation du marquage en microscopie confocale (figure 69).

## Résultats et discussion



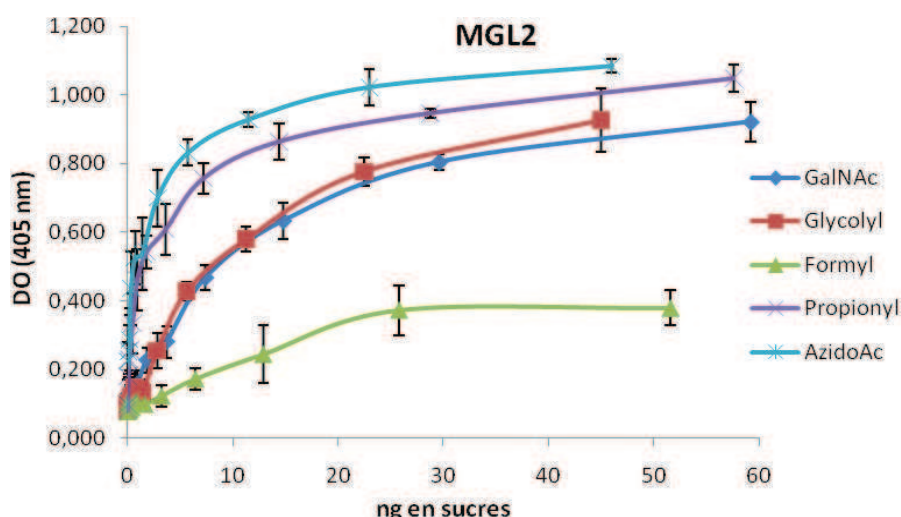
**Figure 69.** Etude par microscopie confocale (objectif 63x) des cellules CHO IdID cultivées en présence des analogues et marquées par l'anticorps 5F4.

Un meilleur marquage à la surface des cellules cultivées en présence de la GalNAc est observé. Pour les autres analogues, le marquage est plus faible voire inexistant dans le cas du formyl. En effet, comme pour l'observation avec les lectines, l'anticorps reflète avant tout la différence d'incorporation des analogues par rapport à la GalNAc. Cependant nous pouvons constater que ces analogues (hormis le formyl pour lequel nous n'avons pas d'image positive) présentent, une fois transférés sur les protéines, une conformation similaire à celle adoptée par la GalNAc puisqu'ils sont aussi reconnus par un anti-Tn.

### III.4.3 Reconnaissance par la lectine animale MGL2

Des travaux récents ayant montré d'une part la reconnaissance des GalNAc par MGL2 sur les cellules dendritiques et d'autre part que cette reconnaissance entrainerait la présentation du sucre par les cellules dendritiques et l'activation du système immunitaire par la production de cellules T, nous avons cherché à savoir si MGL2 pouvait reconnaître les analogues.

Le milieu de culture des cellules HEK 293 transfectées par un plasmide codant pour une forme soluble de MGL2 couplée à un domaine Fc d'immunoglobuline murine a été utilisé en ELISA sur des protéines glycosylées par les analogues (figure 70).



**Figure 70.** Résultats des tests ELISA réalisés sur des MUC1, glycosylés par la GalNAc, la N-glycolyl, N-formyl, N-propionyl et N-azidoAc galactosamine avec un milieu de culture contenant MGL2. Anti IgG de souris couplé à la peroxydase, 1/5000.

La lectine MGL2 reconnaît les analogues testés de la même façon que la GalNAc sauf dans le cas du formyl. Ce résultat confirme les résultats obtenus avec les différentes

lectines et qui laissent supposer que toutes les lectines et anticorps utilisés dans notre étude ne nécessitent pas la présence du groupement acétyl sur la GalNAc pour interagir avec les structures Tn. D'autre part, nous voyons ici que MGL2 ne peut pas être utilisée pour différencier les sucres les uns par rapport aux autres.

Toutefois ces résultats sont intéressants car il a été vu que des cellules dendritiques pouvaient endocyter des MUC1 glycosylés (Vlad *et al.*, 2002). Les glycopeptides sont alors présentés par les DC sans qu'ils soient déglycosylés et ils sont reconnus par des cellules T. L'activation des cellules T pourrait donc se faire après la reconnaissance et l'internalisation des sucres par MGL2. En effet, l'équipe de Van Kooyk a montré qu'un antigène artificiel composé de quelques unités de GalNAc conjuguées sur une protéine permettait, par le biais de MGL2, la présentation de cet antigène aux cellules T CD4 et leur prolifération (Singh *et al.*, 2010). Le même type de résultat a aussi été obtenu par Denda-Nagai *et al.* (2010). Il s'avère donc qu'un antigène artificiel substitué par un petit nombre de GalNAc serait mieux internalisé dans les DC par MGL2 qu'un antigène naturel portant d'avantage de sucres. Il a été montré aussi dans l'étude de l'équipe de van Kooyk, qu'une fois internalisé par les DC de la moelle osseuse et de la rate, l'antigène porteur de GalNAc est présenté au niveau des CMH de classe I et II et ce indépendamment des récepteurs « toll-like ». L'intégration par MGL2 permettait donc la présentation croisée de l'antigène artificiel aux cellules CD8. On peut ainsi imaginer qu'un tel processus soit favorisé avec nos peptides glycosylés par les analogues de la GalNAc. Ceux-ci pourraient donc permettre, après incorporation au niveau d'une tumeur, une activation des cellules T CD4 et CD8.

### III.5 Conclusion

Les analogues de la GalNAc sont substrats de la voie de récupération du GalNAc dans les cellules. Ces sucres sont utilisés par les différentes enzymes de cette voie de synthèse. Ils sont transformés en UDP-sucres puis ils sont incorporés sur les protéines et exprimés à la surface des cellules. Les analogues sont ainsi le sucre initial pour la synthèse de O-glycanes. En effet les glycoconjugués porteurs d'analogues de GalNAc sont également les substrats d'autres glycosyltransférases telles que des sialyltransférases et la B1,3 galactosyltransférase. Lorsque les cellules sont cultivées en présence de galactose et des analogues, la fixation de galactose sur les analogues a été mise en évidence par la lectine PNA en FACS et en microscopie confocale. De même le traitement des cellules par une neuraminidase permet d'augmenter le nombre de sites accessibles à la lectine PNA ce qui laisse supposer la fixation d'acides sialiques sur le motif galactose B1-3 analogue. Les

cellules CHO IdlD ne semblent pas produire l'enzyme ST6GalNAcT I ce qui expliquerait l'absence de structures sialylTn susceptibles d'être révélées par la lectine VVA après désialylation. La transfection des cellules CHO par une construction plasmidique permettant l'expression de cette enzyme serait un moyen de vérifier si les analogues sialylés peuvent être synthétisés *in vivo*, comme nous l'avons démontré grâce à l'enzyme ST6GalNAc I recombinante *in vitro*.

Dans le cadre d'une stratégie de vaccination passive, les sucres modifiés incorporés à la surface des cellules cancéreuses servent de molécules de ciblage pour l'élimination de ces cellules. Dans le cas de nos sucres, deux points essentiels restent à vérifier. Tout d'abord, un moyen spécifique de reconnaissance des analogues doit être développé. En effet avec les injections de glycopeptides, nous n'avons obtenu qu'un anticorps spécifique de l'azidoacétylgalactosamine et ni les lectines testées ni les anti Tn ne permettent de différencier les analogues de la GalNAc. Les sucres modifiés doivent également être incorporés par les cellules tumorales et donc être capable d'entrer en compétition avec la GalNAc naturellement incorporée lors de la *O*-glycosylation de type mucine. Ceci a déjà été extensivement démontré dans le cas de l'azidoacétyl (Hang *et al.*, 2003). Donc si l'on compare d'une part les propriétés des autres analogues que nous avons produits, vis-à-vis des enzymes GK21, AGX1 et ppGaNT1, à celles du dérivé azidoacétyl et d'autre part, l'efficacité d'incorporation obtenue dans les cellules CHO IdlD entre tous les analogues testés, il est tout à fait raisonnable de croire que d'autres dérivés (propionyl, glycolyl, chloroacetyl...) pourront être incorporés aussi bien que l'azidoacétyl.

# ***Conclusions et perspectives***

## Conclusions et perspectives

Les traitements traditionnels contre le cancer consistent en la résection de la tumeur, la chimiothérapie et la radiothérapie pour enrayer les métastases et les tumeurs disséminées. Cependant ces méthodes ne permettent pas vraiment de cibler les cellules cancéreuses. L'identification d'antigènes saccharidiques spécifiques des tumeurs a permis le développement de vaccins synthétiques composés de glycanes ou de glycoconjugués pour tenter d'induire une réponse immune contre les cellules cancéreuses. Cependant, les antigènes glucidiques présents à la surface des cellules cancéreuses sont des structures également présentes sur les cellules normales soit abondamment au cours du développement embryonnaire, soit, bien qu'en faible quantité, sur les cellules matures ; de ce fait, ils ne stimulent pas le système immunitaire de façon efficace. C'est pour cette raison qu'une nouvelle stratégie a été envisagée consistant à introduire des analogues de sucres dans les cellules tumorales afin de créer de nouveaux antigènes glucidiques tumoraux.

Dans une première partie de mon travail, j'ai réalisé la synthèse chimique d'analogues de la GalNAc, un sucre qui est présent dans de nombreux antigènes tumoraux. Une fois purifiés et caractérisés, ces sucres modifiés ont été testés en tant que substrats des enzymes composant la voie de « sauvetage » de la GalNAc. Cette voie permet de récupérer la GalNAc à partir de sources externes et de la transformer en substrats utilisables par les enzymes qui synthétisent les glycoconjugués. Ces études nous ont permis d'établir les caractéristiques cinétiques des analogues vis-à-vis d'une galactokinase (GK2) et d'une UDP-GalNAc-pyrophosphorylase (AGX1). Avec les meilleurs substrats des UDP-sucres ont été préparés puis utilisés comme réactifs pour une polypeptide  $\alpha$ GalNAc transférase. Plusieurs peptides ont alors été *O*-glycosylés sur leurs Ser et Thr. Ces glycopeptides ont à leur tour servi de substrats pour 2 enzymes qui interviennent dans la synthèse des glycanes composant les antigènes tumoraux : la B1,3 galactosyl transférase ou Core1 Galactosyltransférase (C1GalT) et la GalNAc  $\alpha$ 2,6 sialyltransférase I (ST6GalNAc I). Pour résumer, certains des analogues préparés peuvent être incorporés sur des peptides et également être intégrés dans des glycanes plus complexes.

Des souris ont par la suite été immunisées par différents glycopeptides. Des glycopeptides de type mucine portant le sucre naturel ou les analogues n'ont pas permis d'obtenir une meilleure réponse que celle obtenue avec le peptide nu. Pour tenter d'améliorer la réponse immune nous avons réalisé le couplage des glycopeptides portant les analogues sur une protéine porteuse immuno-stimulante. la KLH, puis injecté ces dérivés aux souris. Les résultats obtenus sont difficiles à interpréter même s'il y a une

## Conclusions et perspectives

bonne production d'anticorps. Cependant ces anticorps semblent reconnaître l'épitope peptidique ou l'épitope glycopeptidique. Ces résultats peuvent s'expliquer par le petit nombre de glycanes couplés sur KLH ; en effet il semble que la réponse immune contre de faibles immunogènes comme les antigènes glucidiques dépende directement de la densité de l'antigène. La production d'anticorps spécifiques de sucres selon cette méthode paraît tout de même possible car des résultats encourageants ont été obtenus sur certaines souris et un anticorps spécifique de l'azidoacétylgalactosamine a pu être produit. De nouvelles tentatives avec soit des peptides plus glycosylés soit plus de peptides fixés par KLH pourraient être réalisées.

Les sucres modifiés peuvent être incorporés dans des cellules par la voie de sauvetage. Une fois incorporés dans les glycoconjugués, ils sont exprimés à la surface de ces cellules où ils sont reconnus par des lectines spécifiques de la GalNAc. De plus, du galactose et de l'acide sialique peuvent être ajoutés sur ces *O*-glycanes formés d'analogues de GalNAc fixés sur Ser ou Thr. A présent, il faudrait vérifier si l'incorporation des analogues peut se faire également dans des cellules cancéreuses où la voie de sauvetage de la GalNAc n'est pas la voie principale de synthèse des UDP-GalNAc. Pour tester cela, il faudrait trouver un moyen de différencier les analogues de la GalNAc, également présente dans les cellules. L'obtention d'anticorps spécifiques des sucres est une solution. La synthèse de sucres radiomarqués est également possible. Cependant, certains analogues synthétisés dans ce travail pourraient s'avérer être des inhibiteurs de la voie normale de synthèse de GalNAc, ce qui peut constituer des outils précieux pour l'étude de la biosynthèse et de la fonction des glycanes.

# ***Bibliographie***

## Bibliographie

Aarnoudse, C. A., Garcia Vallejo, J. J., Saeland, E., et van Kooyk, Y. (2006). Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol* 18, 105-111.

Abd Hamid, U. M., Royle, L., Saldo, R., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Storr, S. J., Pardo, M., Antrobus, R., Chapman, C. J., Zitzmann, N., *et al.* (2008). A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology* 18, 1105-1118.

Agrawal, B., Gendler, S. J., et Longenecker, B. M. (1998). The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 4, 397-403.

Alonso, D. F., Gabri, M. R., Guthmann, M. D., Fainboim, L., et Gomez, D. E. (1999). A novel hydrophobized GM3 ganglioside/Neisseria meningitidis outer-membrane-protein complex vaccine induces tumor protection in B16 murine melanoma. *Int. J. Oncol* 15, 59-66.

Angeloni, S., Ridet, J. L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., et Sprenger, N. (2005). Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* 15, 31-41.

Aryal, R. P., Ju, T., et Cummings, R. D. (2010). The endoplasmic reticulum chaperone Cosmc directly promotes in vitro folding of T-synthase. *J. Biol. Chem* 285, 2456-2462.

Baldus, S. E., Zirbes, T. K., Glossmann, J., Fromm, S., Hanisch, F. G., Mönig, S. P., Schröder, W., Schneider, P. M., Flucke, U., Karsten, U., *et al.* (2001). Immunoreactivity of monoclonal antibody BW835 represents a marker of progression and prognosis in early gastric cancer. *Oncology* 61, 147-155.

Baldus, S. E., Zirbes, T. K., Hanisch, F. G., Kunze, D., Shafizadeh, S. T., Nolden, S., Mönig, S. P., Schneider, P. M., Karsten, U., Thiele, J., *et al.* (2000). Thomsen-Friedenreich antigen presents as a prognostic factor in colorectal carcinoma: A clinicopathologic study of 264 patients. *Cancer* 88, 1536-1543.

Berkin, A., Szarek, W. A., et Kisilevsky, R. (2000). Synthesis of 4-deoxy-4-fluoro analogues of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose and their effects on cellular glycosaminoglycan biosynthesis. *Carbohydr. Res* 326, 250-263.

Bourdeaux, V. (2006). Développement d'un système de régénération d'UDP-GalNAc pour la glycosylation enzymatique d'oligosaccharides et de peptides d'intérêt thérapeutique. Available at: [http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?halsid=m288n77304gn623q3duvoio9l7&view\\_this\\_doc=tel-00160999](http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?halsid=m288n77304gn623q3duvoio9l7&view_this_doc=tel-00160999).

Bourdeaux, V., Cadène, M., Piller, F., et Piller, V. (2007). Efficient enzymatic glycosylation of peptides and oligosaccharides from GalNAc and UTP. *Chembiochem* 8, 37-40.

Bourdeaux, V., Piller, F., et Piller, V. (2005). Two-step enzymatic synthesis of UDP-N-acetylgalactosamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 15, 5459-5462.

Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C., et Taylor-Papadimitriou, J. (1995a). Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem* 233, 607-617.

Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C., et Taylor-Papadimitriou, J.

## Bibliographie

(1995b). Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem* 233, 607-617.

Busca, P., et Martin, O. R. (2004). Synthesis of UDP-GalNAc analogues as probes for the study of polypeptide-[alpha]-GalNAc-transferases. Part 2. *Tetrahedron Letters* 45, 4433-4436.

Cai, L., Guan, W., Wang, W., Zhao, W., Kitaoka, M., Shen, J., O'Neil, C., et Wang, P. G. (2009). Substrate specificity of N-acetylhexosamine kinase towards N-acetylgalactosamine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 19, 5433-5435.

Campbell, B. J., Finnie, I. A., Hounsell, E. F., et Rhodes, J. M. (1995). Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J. Clin. Invest* 95, 571-576.

Campbell, C. T., Sampathkumar, S., et Yarema, K. J. (2007). Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Mol Biosyst* 3, 187-194.

Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G. F., et Karsten, U. (1996). Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem. Cell Biol* 106, 197-207.

Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C., Le Bourhis, X., et Delannoy, P. (2009). GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol. Chem* 390, 601-609.

Chapman, P. B., Morrissey, D. M., Panageas, K. S., Hamilton, W. B., Zhan, C., Destro, A. N., Williams, L., Israel, R. J., et Livingston, P. O. (2000). Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin. Cancer Res* 6, 874-879.

Chefalo, P., Pan, Y., Nagy, N., Guo, Z., et Harding, C. V. (2006). Efficient metabolic engineering of GM3 on tumor cells by N-phenylacetyl-D-mannosamine. *Biochemistry* 45, 3733-3739.

Chefalo, P., Pan, Y., Nagy, N., Harding, C., et Guo, Z. (2004). Preparation and immunological studies of protein conjugates of N -acylneuraminic acids. *Glycoconj. J* 20, 407-414.

Coon, J. S., Weinstein, R. S., et Summers, J. L. (1982). Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol* 77, 692-699.

Cremer, G-A. (2005). Nouvelle approche pour l'immunothérapie anti-tumorale : synthèse et évaluation de glycoprotéines modulaires branchées analogues de MUC1 obtenues par ligation chimique. Available at: [http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?halsid=9vmb4kqhneal6u5m4dcc6749e4&view\\_this\\_doc=tel-00011396&version=1](http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?halsid=9vmb4kqhneal6u5m4dcc6749e4&view_this_doc=tel-00011396&version=1).

Cunto-Amesty, G., Monzavi-Karbassi, B., Luo, P., Jousheghany, F., et Kieber-Emmons, T. (2003). Strategies in cancer vaccines development. *Int. J. Parasitol* 33, 597-613.

Danishefsky, et Allen (2000). From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines Frequently used abbreviations are listed

## Bibliographie

in the appendix. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 39, 836-863.

Danussi, C., Coslovi, A., Campa, C., Mucignat, M. T., Spessotto, P., Uggeri, F., Paoletti, S., et Colombatti, A. (2009). A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology* 19, 1056-1067.

Degroote, S., Wolthoorn, J., et van Meer, G. (2004). The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol* 15, 375-387.

Denda-Nagai, K., Aida, S., Saba, K., Suzuki, K., Moriyama, S., Oo-Puthinan, S., Tsuiji, M., Morikawa, A., Kumamoto, Y., Sugiura, D., et al. (2010). Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J. Biol. Chem* 285, 19193-19204.

Dennis, J. W., Granovsky, M., et Warren, C. E. (1999). Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 21-34.

Dube, D. H., et Bertozzi, C. R. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 4, 477-488.

Dube, D. H., Prescher, J. A., Quang, C. N., et Bertozzi, C. R. (2006). Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 4819-4824.

Duffy, M. J. (2006). Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin. Chem* 52, 345-351.

Duk, M., Lisowska, E., Wu, J. H., et Wu, A. M. (1994). The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. *Anal. Biochem* 221, 266-272.

Dziadek, S., Hobel, A., Schmitt, E., et Kunz, H. (2005). A fully synthetic vaccine consisting of a tumor-associated glycopeptide antigen and a T-cell epitope for the induction of a highly specific humoral immune response. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 44, 7630-7635.

Elhammer, A., et Kornfeld, S. (1986). Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine colostrum and murine lymphoma BW5147 cells. *J. Biol. Chem* 261, 5249-5255.

Feizi, T., Fazio, F., Chai, W., et Wong, C. H. (2003). Carbohydrate microarrays - a new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Curr. Opin. Struct. Biol* 13, 637-645.

Fernández Madrid, F., Tang, N., Alansari, H., Karvonen, R. L., et Tomkiel, J. E. (2005). Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. *Autoimmun Rev* 4, 230-235.

Furmanek, A., et Hofsteenge, J. (2000). Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim. Pol* 47, 781-789.

Gamblin, S. J., et Skehel, J. J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem* 285, 28403-28409.

Ghazarian, H., Idoni, B., et Oppenheimer, S. B. (2010). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199800> [Accédé Mars 10, 2010].

- Ghazizadeh, M., Oguro, T., Sasaki, Y., Aihara, K., Araki, T., et Springer, G. F. (1990). Immunohistochemical and ultrastructural localization of T antigen in ovarian tumors. *Am. J. Clin. Pathol* 93, 315-321.
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T. J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L., et Livingston, P. O. (2000). Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin. Cancer Res* 6, 1693-1701.
- Gilewski, T., Ragupathi, G., Bhuta, S., Williams, L. J., Musselli, C., Zhang, X., Bencsath, K. P., Panageas, K. S., Chin, J., Hudis, C. A., *et al.* (2001). Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3270-3275.
- Glinsky, V. V., Glinsky, G. V., Rittenhouse-Olson, K., Huflejt, M. E., Glinskii, O. V., Deutscher, S. L., et Quinn, T. P. (2001). The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 61, 4851-4857.
- Gorsky, Y., Vanky, F., et Sulitzeanu, D. (1976). Isolation from patients with breast cancer of antibodies specific for antigens associated with breast cancer and other malignant diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 73, 2101-2105.
- Gottlieb, H., Kotlyar, V., et Nudelman, A. (1997). NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry* 62, 7512-7515.
- Guan, W., Cai, L., Fang, J., Wu, B., et George Wang, P. (2009). Enzymatic synthesis of UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc analogs using N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase (GlmU). *Chem. Commun. (Camb.)*, 6976-6978.
- Guo, Z., et Wang, Q. (2009). Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines. *Curr Opin Chem Biol* 13, 608-617.
- Hakomori, S. (2000). Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj. J* 17, 627-647.
- Hakomori, S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 56, 5309-5318.
- Hakomori, S., et Zhang, Y. (1997). Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chem. Biol* 4, 97-104.
- Hakomori, S. (2003). Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr. Opin. Hematol* 10, 16-24.
- Haltiwanger, R. S., et Lowe, J. B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem* 73, 491-537.
- Hamilton, W. B., Helling, F., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1993). Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int. J. Cancer* 53, 566-573.
- Hang, H. C., et Bertozzi, C. R. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg. Med. Chem* 13, 5021-5034.

Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L., et Bertozzi, C. R. (2003). A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 14846-14851.

Hanisch, F. G. (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem* 382, 143-149.

Harduin-Lepers, A. (2010). Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiology Insights* 2010, 29.

Hedlund, M., Padler-Karavani, V., Varki, N. M., et Varki, A. (2008). Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 18936-18941.

Helenius, A., et Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.

Helling, F., Shang, A., Calves, M., Zhang, S., Ren, S., Yu, R. K., Oettgen, H. F., et Livingston, P. O. (1994). GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res* 54, 197-203.

Hiltbold, E. M., Poloso, N. J., et Roche, P. A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J. Immunol* 170, 1329-1338.

Huet, G., Gouyer, V., Delacour, D., Richet, C., Zanetta, J. P., Delannoy, P., et Degand, P. (2003). Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells. *Biochimie* 85, 323-330.

Ingale, S., Wolfert, M. A., Gaekwad, J., Buskas, T., et Boons, G. (2007). Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat. Chem. Biol* 3, 663-667.

Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Montgomery, C. K., Kjeldsen, T., Takahashi, H. K., Bigbee, W. L., et Kim, Y. S. (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49, 197-204.

Joosten, J., Evers, B., van Summeren, R., Kamerling, J., et Vliegenthart, J. (2003). Synthesis of beta-D-Galp-(1-4)-beta-D-GlcpNAc-(1-2)-alpha-D-Manp(1-O)(CH<sub>2</sub>)(7)CH<sub>3</sub> mimics to explore the substrate specificity of sialyltransferases and trans-sialidases. *European Journal of Organic Chemistry*, 3569-3586.

Kagan, E., Ragupathi, G., Yi, S. S., Reis, C. A., Gildersleeve, J., Kahne, D., Clausen, H., Danishefsky, S. J., et Livingston, P. O. (2005). Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn. *Cancer Immunol. Immunother* 54, 424-430.

Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., et Kimura, N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* 95, 377-384.

Keppler, O. T., Stehling, P., Herrmann, M., Kayser, H., Grunow, D., Reutter, W., et Pawlita, M. (1995). Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses. *J. Biol. Chem* 270, 1308-1314.

Kim, E. J., Sampathkumar, S., Jones, M. B., Rhee, J. K., Baskaran, G., Goon, S., et

## Bibliographie

Yarema, K. J. (2004). Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of O-hydroxyl- and N-acyl-modified N-acetylmannosamine analogs in Jurkat cells. *J. Biol. Chem* 279, 18342-18352.

Kingsley, D. M., Kozarsky, K. F., Hobbie, L., et Krieger, M. (1986). Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell* 44, 749-759.

van Kooyk, Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem. Soc. Trans* 36, 1478-1481.

Krug, L. M., Ragupathi, G., Ng, K. K., *et al.* (2004). Vaccination of small cell lung cancer patients with polysialic acid or N-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin. Cancer Res* 10, 916-923.

Krug, L. M., Ragupathi, G., Hood, C., *et al.* (2004). Vaccination of Patients with Small-Cell Lung Cancer with Synthetic Fucosyl GM-1 Conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin. *Clinical Cancer Research* 10, 6094-6100.

Kui Wong, N., Easton, R. L., Panico, M., Sutton-Smith, M., Morrison, J. C., Lattanzio, F. A., Morris, H. R., Clark, G. F., Dell, A., et Patankar, M. S. (2003). Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J. Biol. Chem* 278, 28619-28634.

Kumar, S. R., Sauter, E. R., Quinn, T. P., et Deutscher, S. L. (2005a). Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. *Clin. Cancer Res* 11, 6868-6871.

Kumar, S. R., Sauter, E. R., Quinn, T. P., et Deutscher, S. L. (2005b). Thomsen-Friedenreich and Tn Antigens in Nipple Fluid: Carbohydrate Biomarkers for Breast Cancer Detection. *Clinical Cancer Research* 11, 6868-6871.

Laack, E., Nikbakht, H., Peters, A., Kugler, C., Jasiewicz, Y., Edler, L., Hossfeld, D. K., et Schumacher, U. (2002). Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung: helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. *Am. J. Pathol* 160, 1001-1008.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laughlin, S. T., Agard, N. J., Baskin, J. M., Carrico, I. S., Chang, P. V., Ganguli, A. S., Hangauer, M. J., Lo, A., Prescher, J. A., et Bertozzi, C. R. (2006). Metabolic labeling of glycans with azido sugars for visualization and glycoproteomics. *Meth. Enzymol* 415, 230-250.

Lazarevic, D., et Thiem, J. (2002). Syntheses of unnatural N-substituted UDP-galactosamines as alternative substrates for N-acetylgalactosaminyl transferases. *Carbohydr. Res* 337, 2187-2194.

Lazarević, D., et Thiem, J. (2006). Artificial N-functionalized UDP-glucosamine analogues as modified substrates for N-acetylglucosaminyl transferases. *Carbohydr. Res* 341, 569-576.

Li, Q., Anver, M. R., Butcher, D. O., et Gildersleeve, J. C. (2009). Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer

## Bibliographie

vaccines. *Mol. Cancer Ther* 8, 971-979.

Li, Q., Rodriguez, L. G., Farnsworth, D. F., et Gildersleeve, J. C. (2010). Effects of Hapten Density on the Induced Antibody Repertoire. *ChemBioChem* 9999, NA.

Lisowska, E. (2002). The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci* 59, 445-455.

MacLean, G. D., Miles, D. W., Rubens, R. D., Reddish, M. A., et Longenecker, B. M. (1996). Enhancing the effect of THERATOPE STn-KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19, 309-316.

Magalhães, A., Ismail, M. N., et Reis, C. A. (2010). Sweet receptors mediate the adhesion of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*: glycoproteomic strategies. *Expert Rev Proteomics* 7, 307-310.

Marathe, D. D., Buffone, A., Chandrasekaran, E. V., Xue, J., Locke, R. D., Nasirikenari, M., Lau, J. T. Y., Matta, K. L., et Neelamegham, S. (2010). Fluorinated per-acetylated GalNAc metabolically alters glycan structures on leukocyte PSGL-1 and reduces cell binding to selectins. *Blood* 115, 1303-1312.

Marcos, N. T., Pinho, S., Grandela, C., Cruz, A., Samyn-Petit, B., Harduin-Lepers, A., Almeida, R., Silva, F., Morais, V., Costa, J., *et al.* (2004). Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res* 64, 7050-7057.

Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L. E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., et Ando, S. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 5165-5171.

Matsushita, Y., Cleary, K. R., Ota, D. M., Hoff, S. D., et Irimura, T. (1990). Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. *Lab. Invest* 63, 780-791.

McEver, R. P. (1997). Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj. J* 14, 585-591.

McGuire, E. J., et Roseman, S. (1967). Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin. *J. Biol. Chem* 242, 3745-3747.

Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H., et Robbins, P. W. (1969). Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* 8, 2518-2524.

Molina, A. (2008). A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu. Rev. Med* 59, 237-250.

Müller, S., et Hanisch, F. (2002). Recombinant MUC1 Probe Authentically Reflects Cell-specific O-Glycosylation Profiles of Endogenous Breast Cancer Mucin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26103-26112.

Nakagoe, T. Nakagoe, Fukushima, K. Fukushima, Itoyanagi, N. Itoyanagi, Ikuta, Y. Ikuta,

## Bibliographie

Oka, T. Oka, *et al.* (2002). Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 128, 257-264.

Neuberger, A., et Wilson, B. (1971). Separation of glycosides on a strongly basic ion-exchange resin-interpretation in terms of acidity. *Carbohydrate Research* 17, 89-96.

Nguyen, D. H., Tangvoranuntakul, P., et Varki, A. (2005). Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that metabolically incorporates into activated and malignant immune cells. *J. Immunol* 175, 228-236.

Nores, G. A., Dohi, T., Taniguchi, M., et Hakomori, S. (1987). Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J. Immunol* 139, 3171-3176.

Numata, Y., Nakada, H., Fukui, S., Kitagawa, H., Ozaki, K., Inoue, M., Kawasaki, T., Funakoshi, I., et Yamashina, I. (1990). A monoclonal antibody directed to Tn antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 170, 981-985.

Ogata, S., Ho, I., Chen, A., Dubois, D., Maklansky, J., Singhal, A., Hakomori, S., et Itzkowitz, S. H. (1995). Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 55, 1869-1874.

Ohya, C. (2008). Glycosylation in bladder cancer. *Int. J. Clin. Oncol* 13, 308-313.

Oppenheimer, S. B., Alvarez, M., et Nnoli, J. (2008). Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta Histochem* 110, 6-13.

Pan, Y., Chefalo, P., Nagy, N., Harding, C., et Guo, Z. (2005). Synthesis and immunological properties of N-modified GM3 antigens as therapeutic cancer vaccines. *J. Med. Chem* 48, 875-883.

Pancino, G., Osinaga, E., Charpin, C., Mistro, D., Barque, J. P., et Roseto, A. (1991). Purification and characterisation of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4. *Br. J. Cancer* 63, 390-398.

Pastuszak, I., Drake, R., et Elbein, A. D. (1996). Kidney N-acetylgalactosamine (GalNAc)-1-phosphate kinase, a new pathway of GalNAc activation. *J. Biol. Chem* 271, 20776-20782.

Patsos, G., Hebbe-Viton, V., Robbe-Masselot, C., Masselot, D., San Martin, R., Greenwood, R., Paraskeva, C., Klein, A., Graessmann, M., Michalski, J. C., *et al.* (2009). O-glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. *Glycobiology* 19, 382-398.

Pedersen, M. K., Sorensen, N. S., Heegaard, P. M. H., Beyer, N. H., et Bruun, L. (2006). Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations on antibody affinity against a peptide antigen. *J. Immunol. Methods* 311, 198-206.

Peracaula, R., Barrabés, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., et de Llorens, R. (2008). Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis. Markers* 25, 207-218.

Peracaula, R., Tabarés, G., Royle, L., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., et de Llorens, R. (2003). Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-

## Bibliographie

specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* 13, 457-470.

Pham, T., Gregg, C. J., Karp, F., Chow, R., Padler-Karavani, V., Cao, H., Chen, X., Witztum, J. L., Varki, N. M., et Varki, A. (2009). Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood* 114, 5225-5235.

Piller, F., Eckhardt, A. E., et Hill, R. L. (1982). The preparation of UDP-N-acetylgalactosamine from UDP-N-acetylglucosamine employing UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase. *Anal. Biochem* 127, 171-177.

Rabuka, D., Hubbard, S. C., Laughlin, S. T., Argade, S. P., et Bertozzi, C. R. (2006). A chemical reporter strategy to probe glycoprotein fucosylation. *J. Am. Chem. Soc* 128, 12078-12079.

Ragupathi, G., Meyers, M., Adluri, S., Howard, L., Musselli, C., et Livingston, P. O. (2000). Induction of antibodies against GD3 ganglioside in melanoma patients by vaccination with GD3-lactone-KLH conjugate plus immunological adjuvant QS-21. *Int. J. Cancer* 85, 659-666.

Ragupathi, G., Damani, P., Srivastava, G., Srivastava, O., Suchek, S. J., Ichikawa, Y., et Livingston, P. O. (2009). Synthesis of sialyl Lewis(a) (sLe (a), CA19-9) and construction of an immunogenic sLe(a) vaccine. *Cancer Immunol. Immunother* 58, 1397-1405.

Ravindranath, M. H., Muthugounder, S., Presser, N., Ye, X., Brosman, S., et Morton, D. L. (2005). Endogenous immune response to gangliosides in patients with confined prostate cancer. *Int. J. Cancer* 116, 368-377.

Reddy, P., Caras, I., et Krieger, M. (1989). Effects of O-linked glycosylation on the cell surface expression and stability of decay-accelerating factor, a glycopospholipid-anchored membrane protein. *J. Biol. Chem* 264, 17329-17336.

Renkonen, J., Tynnenen, O., Häyry, P., Paavonen, T., et Renkonen, R. (2002). Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am. J. Pathol* 161, 543-550.

Röttger, S., White, J., Wandall, H. H., Olivo, J. C., Stark, A., Bennett, E. P., Whitehouse, C., Berger, E. G., Clausen, H., et Nilsson, T. (1998). Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J. Cell. Sci* 111 ( Pt 1), 45-60.

Royle, L., Campbell, M. P., Radcliffe, C. M., White, D. M., Harvey, D. J., Abrahams, J. L., Kim, Y., Henry, G. W., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E., et al. (2008). HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem* 376, 1-12.

Ryan, S. O., Vlad, A. M., Islam, K., Gariépy, J., et Finn, O. J. (2009). Tumor-associated MUC1 glycopeptide epitopes are not subject to self-tolerance and improve responses to MUC1 peptide epitopes in MUC1 transgenic mice. *Biol. Chem* 390, 611-618.

Sabbatini, P. J., Kudryashov, V., Ragupathi, G., Danishefsky, S. J., Livingston, P. O., Bornmann, W., Spassova, M., Zatorski, A., Spriggs, D., Aghajanian, C., et al. (2000). Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis(y)-protein conjugate vaccine: a phase 1 trial. *Int. J. Cancer* 87, 79-85.

Saeland, E., van Vliet, S. J., Bäckström, M., van den Berg, V. C. M., Geijtenbeek, T. B. H.,

## Bibliographie

Meijer, G. A., et van Kooyk, Y. (2007). The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother* 56, 1225-1236.

Sala, R., MacKinnon, S., Palcic, M., et Tanner, M. (1998). UDP-N-trifluoroacetylglucosamine as an alternative substrate in N-acetylglucosaminyltransferase reactions. *Carbohydrate Research* 306, 127-136.

Sampathkumar, S., Li, A. V., Jones, M. B., Sun, Z., et Yarema, K. J. (2006). Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology. *Nat. Chem. Biol* 2, 149-152.

Sampathkumar, S., Li, A. V., et Yarema, K. J. (2006). Synthesis of non-natural ManNAc analogs for the expression of thiols on cell-surface sialic acids. *Nat Protoc* 1, 2377-2385.

Sawa, M., Hsu, T., Itoh, T., Sugiyama, M., Hanson, S. R., Vogt, P. K., et Wong, C. (2006). Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 12371-12376.

Saxon, E., et Bertozzi, C. R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287, 2007-2010.

Sharon, N., et Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am* 268, 82-89.

Shimizu, M., et Yamauchi, K. (1982). Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J. Biochem* 91, 515-524.

Singh, S. K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Kalay, H., Saeland, E., et van Kooyk, Y. (2010). Tumour-associated glycan modifications of antigen enhance MGL2 dependent uptake and MHC class I restricted CD8 T cell responses. *Int J Cancer*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473945> [Accédé Juin 29, 2010].

Singh, S. K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Weelij, D. R., García-Vallejo, J. J., van Vliet, S. J., Saeland, E., et van Kooyk, Y. (2009). Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Mol. Immunol* 46, 1240-1249.

Slovin, S. F., Ragupathi, G., Adluri, S., Ungers, G., Terry, K., Kim, S., Spassova, M., Bornmann, W. G., Fazzari, M., Dantis, L., *et al.* (1999). Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5710-5715.

Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., et Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* 17, 1R-13R.

Sørensen, A. L., Reis, C. A., Tarp, M. A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., *et al.* (2006). Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology* 16, 96-107.

Sperandio, M., Gleissner, C. A., et Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev* 230, 97-113.

## Bibliographie

Springer, G. F. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J. Mol. Med* 75, 594-602.

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

Sprung, R., Nandi, A., Chen, Y., Kim, S. C., Barma, D., Falck, J. R., et Zhao, Y. (2005). Tagging-via-substrate strategy for probing O-GlcNAc modified proteins. *J. Proteome Res* 4, 950-957.

Stepensky, D., Tzehoval, E., Vadai, E., et Eisenbach, L. (2006). O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. *Clin. Exp. Immunol* 143, 139-149.

Storr, S. J., Royle, L., Chapman, C. J., Hamid, U. M. A., Robertson, J. F., Murray, A., Dwek, R. A., et Rudd, P. M. (2008). The O-linked glycosylation of secretory/shed MUC1 from an advanced breast cancer patient's serum. *Glycobiology* 18, 456-462.

Szumilo, T., Zeng, Y., Pastuszak, I., Drake, R., Szumilo, H., et Elbein, A. D. (1996). Purification to homogeneity and properties of UDP-GlcNAc (GalNAc) pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem* 271, 13147-13154.

Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., et Kannagi, R. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res* 53, 354-361.

Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., et Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 12045-12050.

Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., et Tabak, L. A. (2003). All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13, 1R-16R.

Terasawa, K., Furumoto, H., Kamada, M., et Aono, T. (1996). Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Res* 56, 2229-2232.

Tsuchida, T., Ravindranath, M. H., Saxton, R. E., et Irie, R. F. (1987). Gangliosides of human melanoma: altered expression in vivo and in vitro. *Cancer Res* 47, 1278-1281.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G., et Etzler, M. (2009). *Essentials of Glycobiology* second edition. (Cold Spring Harbor Lab Press).

van Vliet, S. J., van Liempt, E., Saeland, E., Aarnoudse, C. A., Appelmelk, B., Irimura, T., Geijtenbeek, T. B. H., Blixt, O., Alvarez, R., van Die, I., et al. (2005). Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int. Immunol* 17, 661-669.

Wang, Q., Ekanayaka, S. A., Wu, J., Zhang, J., et Guo, Z. (2008). Synthetic and immunological studies of 5'-N-phenylacetyl sTn to develop carbohydrate-based cancer vaccines and to explore the impacts of linkage between carbohydrate antigens and carrier proteins. *Bioconjug. Chem* 19, 2060-2067.

Wang, Q., Zhang, J., et Guo, Z. (2007). Efficient glycoengineering of GM3 on melanoma

## Bibliographie

cell and monoclonal antibody-mediated selective killing of the glycoengineered cancer cell. *Bioorg. Med. Chem* 15, 7561-7567.

Wang, Z. G., Williams, L. J., Zhang, X. F., Zatorski, A., Kudryashov, V., Ragupathi, G., Spassova, M., Bornmann, W., Slovin, S. F., Scher, H. I., *et al.* (2000). Polyclonal antibodies from patients immunized with a globo H-keyhole limpet hemocyanin vaccine: isolation, quantification, and characterization of immune responses by using totally synthetic immobilized tumor antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 2719-2724.

Wang-Gillam, A., Pastuszak, I., et Elbein, A. D. (1998). A 17-amino acid insert changes UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase specificity from UDP-GalNAc to UDP-GlcNAc. *J. Biol. Chem* 273, 27055-27057.

Westerlind, U., Hobel, A., Gaidzik, N., Schmitt, E., et Kunz, H. (2008). Synthetic vaccines consisting of tumor-associated MUC1 glycopeptide antigens and a T-cell epitope for the induction of a highly specific humoral immune response. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 47, 7551-7556.

Wu, J., et Guo, Z. (2006). Improving the antigenicity of sTn antigen by modification of its sialic acid residue for development of glycoconjugate cancer vaccines. *Bioconjug. Chem* 17, 1537-1544.

Yarema, K. J., et Bertozzi, C. R. (1998). Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 2, 49-61.

Yoshida, H., Fuwa, T. J., Arima, M., Hamamoto, H., Sasaki, N., Ichimiya, T., Osawa, K., Ueda, R., et Nishihara, S. (2008). Identification of the *Drosophila* core 1 beta1,3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes. *Glycobiology* 18, 1094-1104.

Yu, A. L., Gilman, A. L., Ozkaynak, M. F., London, W. B., Kreissman, S. G., Chen, H. X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J. G., Matthay, K. K., *et al.* (2010). Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med* 363, 1324-1334.

Yu, L., Andrews, N., Zhao, Q., McKean, D., Williams, J. F., Connor, L. J., Gerasimenko, O. V., Hilken, J., Hirabayashi, J., Kasai, K., *et al.* (2007). Galectin-3 Interaction with Thomsen-Friedenreich Disaccharide on Cancer-associated MUC1 Causes Increased Cancer Cell Endothelial Adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 282, 773-781.

Zhang, S., Cordon-Cardo, C., Zhang, H. S., Reuter, V. E., Adluri, S., Hamilton, W. B., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1997). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int. J. Cancer* 73, 42-49.

Zhang, S., Graeber, L. A., Helling, F., Ragupathi, G., Adluri, S., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1996). Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res* 56, 3315-3319.

Zhang, S., Walberg, L. A., Ogata, S., Itzkowitz, S. H., Koganty, R. R., Reddish, M., Gandhi, S. S., Longenecker, B. M., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1995). Immune sera and monoclonal antibodies define two configurations for the sialyl Tn tumor antigen. *Cancer Res* 55, 3364-3368.

Zhang, S., Zhang, H. S., Cordon-Cardo, C., Ragupathi, G., et Livingston, P. O. (1998).

## Bibliographie

Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin. Cancer Res* 4, 2669-2676.

Zhang, S., Zhang, H. S., Cordon-Cardo, C., Reuter, V. E., Singhal, A. K., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1997a). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer* 73, 50-56.

Zhang, S., Zhang, H. S., Cordon-Cardo, C., Reuter, V. E., Singhal, A. K., Lloyd, K. O., et Livingston, P. O. (1997b). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer* 73, 50-56.

Zhu, J., Wan, Q., Ragupathi, G., George, C. M., Livingston, P. O., et Danishefsky, S. J. (2009). Biologics through chemistry: total synthesis of a proposed dual-acting vaccine targeting ovarian cancer by orchestration of oligosaccharide and polypeptide domains. *J. Am. Chem. Soc* 131, 4151-4158.

## Synthèse et évaluation du métabolisme d'analogues immunogènes de la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc).

### Résumé :

Les glycanes présents à la surface des cellules cancéreuses sont souvent modifiés par rapport à ceux d'une cellule saine. Or ces antigènes glucidiques n'induisent pas de réponse immune efficace. La GalNAc est le premier sucre fixé lors de la *O*-glycosylation de type mucine et ainsi ce sucre entre dans la composition de nombreux antigènes tumoraux.

Le but de notre travail était de préparer des analogues synthétiques de la GalNAc susceptibles d'être incorporés à la surface de cellules cancéreuses et dans les mucines synthétisées par les tumeurs, afin d'augmenter la réponse immune vis-à-vis des glycanes tumoraux.

Nous avons synthétisé chimiquement des analogues de la GalNAc afin de les tester *in vitro* en tant que substrats de la voie de « sauvetage » de la GalNAc chez les mammifères et donc d'enzymes impliquées dans cette voie : une kinase (GK2) et une UDP-pyrophosphorylase (AGX1) humaines. Les meilleurs candidats ont permis la synthèse de différents UDP-sucre et une GalNAc-transférase (ppGalNAc T1) bovine a pu être utilisée *in vitro* pour transférer certains de ces analogues, à partir de leur forme activée en UDP-sucre, sur des peptides. Nous avons donc pu montrer que certains des analogues synthétisés étaient capables de s'intégrer dans la voie de sauvetage et d'être incorporés dans des peptides. Le pouvoir immunologique des glycoconjugués de type mucine ainsi formés a été étudié chez la souris après couplage de ces glycoprotéines à une protéine immunostimulante (KLH). D'autre part, des cellules de mammifères ont également été cultivées en présence de ces analogues afin de vérifier leur incorporation au niveau des glycoconjugués de la surface des cellules.

**Mots clés :** analogue de la GalNAc, glycoconjugué, voie de « sauvetage », mucine, antigènes glucidiques tumoraux

## Synthesis and evaluation of the metabolism of immunogenic *N*-acetylgalactosamine analogs

### Abstract:

Glycans are often present at the cancerous cell surface in a modified form compared to healthy cells. However, these carbohydrate antigens don't lead to an effective immune response. GalNAc is the first sugar attached to mucin type *O*-glycans and is thus a component of numerous tumor antigens.

The aim of our work was to prepare synthetic GalNAc analogs able to be incorporated at the surface of cancer cell and into mucins synthesized by tumors in order to increase the immune response toward tumor glycans.

We chemically synthesized GalNAc analogs to test them *in vitro* as substrates of enzymes involved in the mammalian GalNAc salvage pathway: a human galactokinase (GK2) and a human UDP-pyrophosphorylase (AGX1). The best candidates allowed the synthesis of the corresponding UDP-sugars further used to test the transfer of those analogs onto peptides using a bovine GalNAc transferase (ppGalNAc T1). We have shown that some synthetic analogs could be integrated in the GalNAc salvage pathway and *O*-linked to peptides. Immunological properties of the glycoconjugates thus formed were studied in mice after coupling to an immunostimulant protein (KLH). Moreover, mammalian cells were cultivated in the presence of these analogs in order to check their incorporation into glycoconjugates at the cell surface.

**Key-words:** GalNAc analog, glycoconjugate, salvage pathway, mucin, tumor carbohydrate antigens



Centre de Biophysique Moléculaire  
CNRS UPR 4301  
Rue Charles Sadron  
45071 ORLEANS cedex 02

