

# **TABLE DES MATIERES**

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	4
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	9
<b>LISTES DES FIGURES</b> .....	11
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	15
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	17
1. Introduction.....	18
2. Objectifs .....	20
2.1 Objectif principal .....	20
2.2 Objectifs secondaires.....	20
2.3 Hypothèse de travail.....	20
<b>EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	22
1. Les glucides et glycoconjugués .....	23
1.2 Relations structure-fonction .....	24
1.3 La glycosylation cellulaire .....	25
1.4 La glycopathologie .....	25
1.5 Les glycoconjugués .....	27
1.5.1 Les glycoprotéines .....	28
1.5.2 Les différents types de glycosylation.....	29
1.5.2.1 La N-glycosylation.....	29
1.5.2.2 La O-glycosylation .....	30
1.5.2.3 La C-glycosylation .....	32
1.6 Structures des chaînes glycaniques des glycoprotéines .....	33
1.6.1 Structure des N-glycannes.....	33
1.6.2 Structure des O-glycannes de type mucine .....	36
1.6.3 Structure des glycannes des glycolipides.....	38
1.7 Fonctions des glycannes des glycoprotéines.....	39
2. Biosynthèse des glycoprotéines.....	41

3. Catabolisme des glycoprotéines .....	44
3.1 Dégradation des N-glycosylprotéines .....	46
3.2 Dégradation des O-glycosylprotéines .....	47
4. Les enzymes de la glycosylation .....	48
4.1 Les glycosidases .....	48
4.2 Les glycosyltransférases .....	48
4.3 La fucosylation .....	50
4.3.1 Le Fucose et son rôle biologique .....	50
4.3.2 Les fucosyltransférases .....	51
4.4 La sialylation .....	52
4.4.1 Les acides sialiques et leurs rôles biologiques .....	52
4.4.3 Les sialyltransférases .....	54
4.4.4 Les sialidases .....	55
5. Glycoconjugués et cancers .....	55
6. Les oligosaccharides des glycoprotéines et la migration cellulaire .....	58
6.1 Les Intégrines comme récepteurs de matrice extracellulaire .....	59
6.2 Structure des intégrines .....	60
6.3 Intégrines dans le Cancer humain .....	61
6.4 Intégrines et migration cellulaire .....	61
6.5 Participation de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la motilité de cellules .....	62
7. Méthodes d'analyses des monosaccharides et glycoprotéines .....	64
7.1 Détermination de la composition centésimale en monosaccharides par méthodes colorimétriques .....	64
7.1.1 Dosage des oses neutres et acides uroniques .....	64
7.1.1.1 Dosage des monosaccharides neutres .....	65
7.1.1.2 Dosage des acides uroniques .....	65
7.1.2 Dosage des osamines .....	65
7.1.3 Dosage des acides sialiques .....	65
7.1.3.1 Dosage des acides sialiques conjugués .....	65
7.1.3.2 Dosage des acides sialiques libres .....	66

7.2 Purification des glycoprotéines .....	66
7.2.1 Méthodes de relargage .....	66
7.2.2 Méthodes chromatographique par immunoaffinité.....	67
7.3 Préparation de glycopeptides membranaires .....	67
7.4 Méthodes d'analyse des glycoprotéines .....	68
7.4.1. Détection de glycoprotéines .....	69
7.4.1.1. Méthode de fixation et coloration .....	69
7.4.1.2 Méthode de détection par affinité.....	69
7.4.1.2.1 Méthode aux Lectines.....	69
7.4.1.2.2 Méthode Enzymatique .....	70
7.4.1.2.3 Méthode basée sur des anticorps.....	71
7.5 Procédés de libération des glycannes .....	71
7.5.1 Méthodes chimiques.....	71
7.5.1.1 Hydrazinolyse .....	71
7.5.1.2 Coupure alcaline.....	71
7.5.2 Méthodes enzymatiques .....	72
7.5.2.1 Coupure par les peptide-N-glycosidases.....	72
7.5.2.2 Coupure par les endo-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases .....	73
8. La spectrométrie de masse appliquée à l'étude de biomolécules.....	74
8.1 Généralités sur la spectrométrie de masse.....	74
8.1.1 Le détecteur .....	74
8.1.2 Les sources d'ionisation.....	75
8.1.3 Les analyseurs .....	76
8.1.4 La spectrométrie de masse en tandem.....	77
8.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	79
8.2.1. Introduction .....	79
8.2.2 La matrice MALDI .....	80
8.2.3 Le mécanisme d'ionisation MALDI .....	81
8.2.3.1 Excitation des molécules de matrice .....	82
8.2.3.2. Emission des ions en phase gazeuse.....	82
8.2.3.3 Ionisation des molécules en phase gazeuse.....	83
8.2.4 L'analyseur à temps de vol .....	83
8.2.4.1 Le MALDI-TOF linéaire .....	83
8.2.4.2 Le MALDI-TOF avec réflecteur et extraction retardée.....	84

8.2.5 La fragmentation en MALDI-TOF .....	86
8.2.5.1 Le PSD ou « Post Source Decay ».....	86
8.2.5.2 Analyse en PSD .....	87
8.3 La fragmentation protéo-oligosaccharidique.....	88
8.3.1 Nomenclature des fragments peptidiques .....	88
8.3.2 La fragmentation des oligosaccharides .....	89
8.3.2.1 Nomenclature de fragmentation des polysaccharides.....	89
8.3.2.2 Les fragmentations des polysaccharides à haute et basse énergie.....	90
8.3.2.3 La détermination de la séquence et du motif de branchement des polysaccharides.....	90
8.3.2.4 La détermination des isoméries de position.....	91
8.4 Stratégies pour la caractérisation des protéines N-glycosylées par spectrométrie de masse.....	92
8.4.1 Analyse des glycoprotéines entières .....	93
8.4.1.1 Techniques de séparation et de concentration.....	93
8.4.1.2 Analyse directe sur gel de polyacrylamide et membrane de PVDF .....	94
8.4.2 Analyse de glycoprotéines entières par spectrométrie de masse .....	94
8.4.3 Analyse MS des N-glycannes des peptides déglycosylés. ....	96
8.4.4 Détection des glycannes grâce aux ions diagnostiques.....	99
8.4.5 L'analyse MS des glycopeptides.....	101
8.5 Séquençage et localisation des points de branchement des glycannes par MS.....	103
<b>EXPOSE DES TRAVAUX REALISES .....</b>	<b>105</b>
1. Méthodologies et résultats .....	106
1.1 Etude des mucoprotéines.....	106
1.1.1 Type de l'étude.....	106
1.1.2 Prélèvements .....	106
1.1.3 Méthodes de dosage des mucoprotéines .....	107
1.1.4 Résultats .....	107
1.1.5 Discussion.....	110
1.2 Dosage du fucose.....	112
1.2.1 type de l'étude .....	112
1.2.2 Prélèvements .....	113
1.2.3 Méthode de dosage du fucose .....	113

1.2.4 Resultats .....	114
1.2.5 Discussion .....	119
1.3 Dosage de l'acide sialique .....	121
1.3.1 Type de l'étude.....	121
1.3.2 Méthode de dosage.....	122
1.3.3 Résultats .....	122
1.3.4 Discussion .....	129
1.4 Etude par spectrométrie de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ .....	132
1.4.1 Type d'étude.....	132
1.4.2 Méthodes .....	132
1.4.3. Protocole d'étude .....	132
1.4.3.1 Culture cellulaires .....	132
1.4.3.2 Chromatographie d'affinité .....	133
1.4.3.3 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunodetection des sous-unités $\alpha 3$ et de $\beta 1$ .....	133
1.4.3.4 Analyse des chaînes des Glycannes .....	134
1.4.3.5 Digestions par les Glycosidases .....	134
1.4.3.6 Extraction des sucres .....	134
1.4.3.7 Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS .....	134
1.4.3.8 Analyse des intégrines par ELISA .....	135
1.4.4 Résultats .....	135
1.4.5 Discussion .....	143
<b>CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES</b> .....	147
1. Conclusion .....	148
2. Perspectives .....	151
<b>ANNEXES</b> .....	152
Annexe 1 .....	153
Annexe 2 .....	162
Annexe 3 .....	165
Annexe 4 .....	167
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	170
<b>RESUME</b> .....	194

## *LISTE DES TABLEAUX*

<b>Tableau 1</b> : Principaux noyaux des chaînes O-glycanniques de type mucine.....	30
<b>Tableau 2</b> : Structure des principaux motifs glycanniques d'antigènes tissulaires identifiés chez l'homme.....	35
<b>Tableau 3</b> : Noms et structures majeures du core des glycosphingolipides des vertébrés..	38
<b>Tableau 4</b> : Principaux glycanes associés aux tumeurs. ....	56
<b>Tableau 5</b> : Lectines et leurs affinités spécifiques pour les glycanes. ....	70
<b>Tableau 6</b> : Concentrations de différents contaminants tolérés par la technique MALDI-TOF. .	79
<b>Tableau 7</b> : Liste des différents lasers utilisés pour l'ionisation MALDI. ....	79
<b>Tableau 8</b> : Matrices les plus couramment utilisées pour l'étude de biomolécules en spectrométrie de masse MALDI-TOF. ....	81
<b>Tableau 9</b> : principaux mécanismes d'activation rencontrés en PSD [Spengler, 1997].....	86
<b>Tableau 10</b> : Différentes matrices utilisées en MALDI et leurs applications.....	87
<b>Tableau 11</b> : Statistiques descriptives des concentrations des mucoprotéines des patients et contrôles.....	108
<b>Tableau 12</b> : Valeurs des concentrations des mucoprotéines sériques chez les patients, les contrôles et de la valeur de référence. ....	109
<b>Tableau 13</b> : Test statistique de comparaison des concentrations des mucoprotéines .....	109
<b>Tableau 14</b> : Récapitulatif des valeurs du fucose enregistrés.....	115
<b>Tableau 15</b> : Tests statistiques de comparaison de la concentration du fucose entre les différents échantillons des populations d'étude .....	116
<b>Tableau 16</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique sous ses différentes formes selon l'état de la maladie chez les patients et les sujets contrôles. ....	124
<b>Tableau 17</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique sous ses différentes formes selon le sexe chez les patients et les sujets contrôles.....	125

<b>Tableau 18</b> : Comparaison des valeurs de l'acide sialique entre les patients avec métastases et les sujets témoins.....	128
<b>Tableau 19</b> : Comparaison des valeurs de l'acide sialique entre les patients avec et sans métastases.....	129
<b>Tableau 20</b> : Caractéristiques des lignées cellulaires HT 29 et SW 620.....	132
<b>Tableau 21</b> : Structures théoriques des glycanes observées par les spectres MALDI MS.....	139
<b>Tableau 22</b> : Compositions des glycanes proposées pour les signaux obtenus par MALDITOF/MS.....	140
<b>Tableau 23</b> : Les principales sources d'ionisation utilisées dans les analyses de glycomique. .	153
<b>Tableau 24</b> : Les principaux analyseurs utilisés dans les analyses de glycomique.....	154
<b>Tableau 25</b> : Masses des glycanes des sous unités $\alpha 3\beta 1$ des lignés cellulaires épithéliales urétérale humaines HCV29 obtenus par spectrométrie MALDI TOF. ....	160
<b>Tableau 26</b> : Masses des résidus des monosaccharides.....	164
<b>Tableau 27</b> : Les différents types de glycosylation des protéines des mammifères.....	167
<b>Tableau 28</b> : Liste des différentes glycosyltransférases.....	168

## *LISTES DES FIGURES*

<b>Figure 1 :</b> Structure des glucides, oligosaccharides et polysaccharides. ....	24
<b>Figure 2 :</b> Les cinq differents types de liaisons saccharide-peptide identifiés. ....	28
<b>Figure 3 :</b> Les différents types des monosaccharides des glycoprotéines. ....	29
<b>Figure 4 :</b> Type d'assemblage des glycoprotéines.....	33
<b>Figure 5 :</b> Structure des principaux motifs antigéniques communs aux N- et O-glycannes. ....	36
<b>Figure 6 :</b> Structures composites illustrant la diversité des séquences portées par les noyaux O-glycanniques. ....	37
<b>Figure 7 :</b> Différentes voies de biosynthèse des structures de base (cores) des O-glycannes de type mucine. ....	42
<b>Figure 8 :</b> Voies de biosynthèse des glycannes N-liés.....	43
<b>Figure 9 :</b> Schéma illustrant le catabolisme lysosomal bidirectionnel des N-glycosylprotéines chez l'homme. ....	47
<b>Figure 10 :</b> La synthèse <i>de novo</i> du GDP-fucose. ....	50
<b>Figure 11 :</b> La voie de sauvetage du GDP-Fuc. Synthèse à partir du L-fucose. ....	51
<b>Figure 12 :</b> Activité de l' $\alpha(1,6)$ fucosyltransférase FUT8. ....	52
<b>Figure 13 :</b> Squelette de l'acide sialique et les différentes substitutions possibles. ....	53
<b>Figure 14 :</b> Famille des recepteurs des intégrines.. ....	59
<b>Figure 15 :</b> Représentation schématique d'une intégrine avec ses deux chaînes $\alpha$ et $\beta$ . ....	60
<b>Figure 16 :</b> Structure des chromogènes utilisés. ....	64
<b>Figure 17 :</b> Dérivés furfuraliques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. ....	64
<b>Figure 18 :</b> Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse.	75



<b>Figure 19</b> : Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) à deux analyseurs.....	77
<b>Figure 20</b> : Mécanisme d'ionisation MALDI.....	82
<b>Figure 21</b> : Principe de l'analyseur à temps de vol couplé à une source MALDI.....	84
<b>Figure 22</b> : Principe de la source à extraction retardée : <b>a.</b> l'extraction continue, <b>b.</b> l'extraction retardée. ....	85
<b>Figure 23</b> : Principe d'un spectromètre en temps de vol avec extraction retardée et réflectron couplé à une source MALDI. ....	86
<b>Figure 24</b> : Schéma des niveaux de fragmentations des peptides .....	88
<b>Figure 25</b> : Nomenclature de la fragmentation des polysaccharides.....	89
<b>Figure 26</b> : Réarrangements intracycliques à l'origine des ions $A_i$ et $X_i$ .....	91
<b>Figure 27</b> : Stratégie générale employée pour le profilage et la caractérisation structurale des N- et O-glycannes des glycoprotéines. ....	93
<b>Figure 28</b> : Schéma des produits de digestion enzymatique des protéines et des peptides glycosylés. ( <b>A</b> ) la PNGase F et ( <b>B</b> ) l'Endo H.....	97
<b>Figure 29</b> : Diagramme de la stratégie d'analyse des glycoprotéines entières.....	98
<b>Figure 30</b> : Structures chimiques des ions oxoniums servant d'ions diagnostiques. ....	99
<b>Figure 31</b> : Positions des liaisons à fragmentées pour la génération de l'ion $m/z$ 366 .....	100
<b>Figure 32</b> : Schéma de la stratégie utilisé pour déterminer le nombre de sites glycosylés et éventuellement le nombre de glycoformes à partir d'un spectre MALDI-TOF-MS d'une glycoprotéine. ....	101
<b>Figure 33</b> : Exemple de Spectre nano-ESI-Q/TOF-MS/MS.....	104
<b>Figure 34</b> : Distributions des valeurs des mucoprotéines sériques des deux contrôle et pathologique. ....	108
<b>Figure 35</b> : Représentation graphique de comparaison des résultats des concentrations des mucoprotéines.....	110



<b>Figure 36</b> : Valeurs des concentrations du fucose de la fraction insoluble. ....	116
<b>Figure 37</b> : Valeurs des concentrations du fucose de la fraction soluble.....	117
<b>Figure 38</b> : Valeurs des concentrations du fucose total. ....	117
<b>Figure 39</b> : Courbe de corrélation des concentrations du fucose de la fraction insoluble et du fucose total.....	118
<b>Figure 40</b> : Courbe de corrélation des concentrations du fucose de la fraction soluble et du fucose total. ....	118
<b>Figure 41</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique total selon le sexe et l'atteinte.....	125
<b>Figure 42</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique lié selon le sexe et l'atteinte.....	126
<b>Figure 43</b> : Valeurs des concentrations des protéines totales selon le sexe et l'atteinte. ....	126
<b>Figure 44</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique libre selon le sexe et l'atteinte. ....	127
<b>Figure 45</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique lié sur protéines totales selon le sexe et l'atteinte. ....	127
<b>Figure 46</b> : Valeurs des concentrations de l'acide sialique total sur protéines totales selon le sexe et l'atteinte. ....	128
<b>Figure 47</b> : Electrophorèse du produit purifié par colonne GD6 par SDS/PAGE <i>coloration par bleu de coomassie et identification des sous unités <math>\alpha 3</math> et <math>\beta 1</math> par des anticorps spécifiques anti-<math>\alpha 3</math> et anti-<math>\beta 1</math>.</i> ....	136
<b>Figure 48</b> : Electrophorèse du produit purifié par colonne GD6 des sous unités $\alpha 3$ et $\beta 1$ <i>traité ou non par l'enzyme de déglycosylation PNGase-F.</i> ....	136
<b>Figure 49</b> : Spectre de masse MALDI MS des N-glycannes obtenu par la digestion de PNGase-F de la sous unité $\alpha 3$ (A) et $\beta 1$ (B) des cellules HT29.....	137
<b>Figure 50</b> : Spectre de masse MALDI MS des N-glycannes obtenu par la digestion de PNGase-F de la sous unité $\alpha 3$ (A) et $\beta 1$ (B) des cellules SW620.....	138
<b>Figure 51</b> : Diagramme de distribution des différents types des N-glycannes des deux lignés cellulaires HT29 et SW620.....	141

<b>Figure 52 :</b> Diagramme de fixation des protéines de la matrice extracellulaire aux intégrines $\alpha3\beta1$ purifiées déglycosylées par PNGase F et/ou traitées par neuraminidase. ....	142
<b>Figure 53:</b> Schema du dépôt de la matrice « <i>Dried-droplet method</i> ». ....	155
<b>Figure 54:</b> Photographie d'une cible MALDI (Applied Biosystems).. ....	155
<b>Figure 55 :</b> Calcul de la résolution. ....	163

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

$\alpha$ -CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
$\beta$ -HCG	$\beta$ -human chorionic gonadotrophin
ADN	Acide désoxyribonucléique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine Serum albumin
CDG	Carbohydate-Disorders of Glycosylation
CID	Dissociation induite par collision
CMP	Cytosine monophosphate
COG	Conserved oligomeric Golgi complex
DIG	Digoxigénine
ECD	Electron Capture Dissociation
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoïétine
ERAD	Endoplasmic Reticulum associated degradation
ESI	Electrospray Ionization
ETD	Electron Transfert Dissociation
EthN	Ethanolamine
FSA	Free sialic acide
FSH	Follicle-stimulating hormone
FT-ICR	Résonance cyclotron à transformée de Fourier
Fuc	Fucose
FUT	Fucosyltransférase
GAG	Glycosaminoglycannes
Gal	Galactose
GalNac	N-acetyl-galactosamine
GD6	Peptide (KQNCLSSRASFRGCVRNLRSLR) based on Laminin11.1
GDP	Guanosine diphosphate
Glc	Glucose
GlcNac	N-acetylglucosamine
GlcUA	Acide glucuronique
GnT-	N-acetyl glucosamine transferase
GSL	Glycosphingolipide
H	Hydrogène
HCl	Chlorure d'hydrogène
HEV	High endothelial veinules
HMW	High marquer weight
IgG	Immunoglobulines G
Il	Interleukine
IS	Immunoabsorbant
IT-Q	Trappe ionique quadrupolaire
KO	Knock out
LacDiNac	N,N'-diacétyllactosamine
LacNac	N-acétyllactosamine
LH	Luteinizing hormone
m/z	Rapport masse sur charge
MALDI-TOF	Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice
Man	Mannose
MBP	Mannose-binding protein

MS	Spectrométrie de masse
Na	Sodium
NeuNAc	Acide N-acetylneuraminique
PAS	Base de Schiff
PIG	Glycophosphatidylinositol
PNGase-F	Peptidyl N-glycosidase F
PVDF	Polyvinylidène Membrane
Q	Analyseur Quadripôle
RE	Reticulum endoplasmique
RGD	Séquence en acide aminés Arg-Gly-Asp
Rha	Rhamnose
Rnase	Ribonucléase
S	Sulfate
SA	Acide sinapinique
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl-Sulfate-PolyAcrylamide
Ser	Serine
Sia	Sialic acid
SIGLEC	Sialic acid-binding IgG-like lectins
sLea	sialyl-Lewis a
sLex	sialyl-Lewis x
SPE	Gel Electrophoresis
ST	Sialyltransférase
TFA	Trifluoroacétates
TGF- $\beta$	Transforming growth factors $\beta$
Th	Thomson
Thr	Thréonine
TLR	Toll-like receptors
TOF	Analyseur en temps de vol
TP	Total protein
Trp	Tryptophane
TSH	Thyrotrophin-stimulating hormone
Tyr	Tyrosine
UDP	Uridine diphosphates
UV	Ultraviolet
Xly	Xylose

## ***INTRODUCTION GENERALE***

# 1. Introduction

La glycosylation est une réaction enzymatique qui consiste à l'ajout d'un résidu glucidique sur un groupement accepteur d'un aminoacide et concerne environ 50%<sup>[1]</sup> des protéines cellulaires. Cette réaction est médiée par des glycosyltransférases et donne lieu à une liaison covalente entre le résidu et le groupement accepteur dont les principaux sont les groupements hydroxyles (O-glycosylation) et les groupements amines (N-glycosylation) portés par les peptides et les protéines. Elles seraient codées par 1 à 2% du génome total chez l'homme<sup>[2]</sup>. Pour permettre l'édification de ces structures glucidiques, la cellule utilise environ dix monomères glucidiques que sont : le fucose, le galactose, le glucose, le N-acétylgalactosamine, le N-acétylglucosamine, l'acide glucuronique, l'acide iduronique, le mannose, l'acide sialique et le xylose. D'autres dérivés peuvent également être retrouvés mais en quantité moindre. Ces structures glucidiques sont fréquemment fixées sur l'asparagine, la sérine, et la thréonine, mais il existe d'autres sites de fixation plus rares comme l'arginine, l'hydroxylysine, l'hydroxyproline, la tyrosine ou encore le tryptophane<sup>[3]</sup>.

Bien que très complexe, la glycosylation intervient dans de nombreux processus physiologiques. Elle participe à la configuration tridimensionnelle des protéines, et intervient dans de nombreux mécanismes de reconnaissance moléculaire<sup>[4]</sup>. De plus elle participe aussi aux interactions cellules à cellules, aux interactions ligand-récepteur, la réponse immunitaire et à l'apoptose. Cela conduit à des perturbations de la glycosylation soient ainsi impliquées dans des pathologies notamment, dans les défaillances du système immunitaire, les maladies neurodégénératives, ou encore dans l'apparition de cancers<sup>[2]</sup>.

Les glycannes, structures glucidiques produit de la glycosylation des protéines sont impliqués dans le rôle biologique des glycoprotéines de façon subtile en modulant leurs propriétés physico-chimiques. En effet, de par leur caractère hydrophile et parfois électro-négatif, ils contribuent à la mise en place et au maintien de la structure spatiale des glycoprotéines et des glycolipides. Cette dernière étant souvent essentielle pour que les glycoprotéines soient biologiquement actives<sup>[5][4]</sup>.

Les glycoprotéines jouent un rôle dans la construction des organes multicellulaires complexes et des organismes qui exigent un système de reconnaissance inter et extracellulaire. La nature des glycoconjugués membranaires, glycolipides, glycoprotéines et protéoglycanes, ont fait l'objet de nombreux travaux<sup>[6][7]</sup> dans le but, d'expliquer l'apparition de propriétés particulières des cellules transformées, telles que la perte de l'inhibition de contact qui fait apparaître la faculté de migration des cellules et créer des métastases. Cette dernière est une condition requise et implique la survenue de perturbations importantes au niveau des molécules qui assurent les mécanismes de reconnaissance

et d'ancrage entre les cellules et la matrice extracellulaire<sup>[8]</sup>. Par conséquent, ces protéines d'adhérence permettent aux cellules de se fixer aux éléments de la matrice extracellulaire par l'existence de différentes séquences d'acides aminés distincts portant des chaînes glycaniques. Ces dernières, une fois modifiées, peuvent être à l'origine de certaines pathologies, comme dans le cas de certains cancers<sup>[9]</sup>.

L'étude de ces molécules est un domaine d'extrême importance pour la compréhension de divers sujets à la fois physiologique et pathologique. Leur importance a également été démontrée à travers la sévérité des présentations cliniques et les taux de morbidité et de mortalité importants des patients souffrant de pathologies métaboliques congénitales des glycoprotéines<sup>[10]</sup>. Il apparaît donc important d'étudier la structure des glycanes des glycoprotéines afin de comprendre les processus biologiques associés.

Ainsi, au cours de la glycosylation, l'addition des résidus glucidiques représente près de 40% de la masse de la protéine, et constitue un moyen efficace pour protéger les protéines sécrétées des attaques des protéases extracellulaires et faciliter leur purification<sup>[11]</sup>. De ce fait, la demi-vie de ces protéines dans les fluides biologiques est augmentée en plus de leur solubilité dans les milieux aqueux. Cela a permis leur détection plus facile chez les patients et a amélioré leur utilisation comme facteurs de diagnostic et/ou de pronostic des cancers<sup>[8]</sup>.

En sachant que la plupart des protéines sécrétées par les cellules sont glycosylées, ces dernières constituent à elles seules une réserve extrêmement importante de biomarqueurs tumoraux<sup>[12]</sup>. D'une manière générale, les protéines majoritairement O-glycosylées sont adressées au compartiment intracellulaire, alors que les protéines N-glycosylées sont surtout adressées à la face externe de la membrane plasmique et au milieu extracellulaire (sécrétion)<sup>[13]</sup>. Il est techniquement impossible d'avoir une vision globale du glycoprotéome. C'est ainsi que les méthodes d'analyse ne permettent pas de regrouper l'analyse de la structure des sucres fixés sur les protéines tout en ayant accès à d'autres informations comme le site sur lequel est fixé le groupement glucidique et sa séquence. Afin de mieux caractériser les interactions entre ces protéines et la matrice extracellulaire ou cellulaire, nous avons orienté notre travail sur l'analyse quantitative et qualitative des glycosylations portées par ces glycoprotéines.

L'analyse des glycanes des protéines est compliquée par leur diversité et leur grand nombre de combinaisons potentielles de glycosylation. En effet, une seule protéine peut subir un nombre important de N et O-glycosylations et un même site de glycosylation peut être occupé par différents types de glycanes ce qui génère un phénomène de microhétérogénéité. La technique la plus communément utilisée est l'hydrolyse acide qui permet l'obtention de monosaccharides sous leur



forme réduite. Ces techniques reposent sur l'utilisation des acides organiques volatiles qui sont facilement éliminés après hydrolyse. Ainsi les oses libres sont dosés par des méthodes colorimétriques qui sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides. Elles s'appliquent aussi bien aux résidus qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les monosaccharides. En ce qui concerne l'étude structurale des glycoprotéines la technique de choix est la spectrométrie de masse après leur purification par diverses techniques biochimiques.

Depuis une dizaine d'années, la spectrométrie de masse a permis de répondre à de nombreuses questions biologiques<sup>[5]</sup> concernant l'identification des protéines et leur caractérisation (modifications post-traductionnelles, modifications chimiques, mutations d'acides-aminés...). Ainsi, la caractérisation de protéines N-glycosylées nécessite la mise en place d'une méthodologie combinant plusieurs techniques aussi bien au niveau de la préparation d'échantillon, de l'acquisition des données et leur interprétation.

## **2. Objectifs**

Les objectifs de notre étude consistent à étudier les glycoprotéines par leur aspect quantitatif et qualitatif structural dans les pathologies tumorales.

### **2.1 Objectif principal**

- Quantification des glycoprotéines et caractérisation structurale de leur séquence glycanique par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

### **2.2 Objectifs secondaires**

- Mise au point de technique d'analyse des glycoprotéines par le dosage des mucoprotéines, du fucose et de l'acide sialique total, dans le sang chez les patients ayant un cancer.
- Etude d'une glycoprotéine ciblée par extraction sélective et utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'analyse structurale des glycannes de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  et leurs implications dans la migration cellulaire.
- Maîtrise de l'instrumentation et des protocoles d'analyse par spectrométrie de masse appliqués à la biologie.

### **2.3 Hypothèse de travail**

Les tumeurs sont douées d'un potentiel évolutif très aléatoire dans la mesure où certaines récidivent sur un mode superficiel alors que d'autres évoluent vers l'infiltration. C'est pourquoi, il semble utile de pouvoir mieux caractériser le potentiel agressif des différents types de cellules

tumorales. Pour ce faire, l'utilisation de marqueurs prédictifs paraît intéressante notamment pour l'instauration de thérapie ciblée.

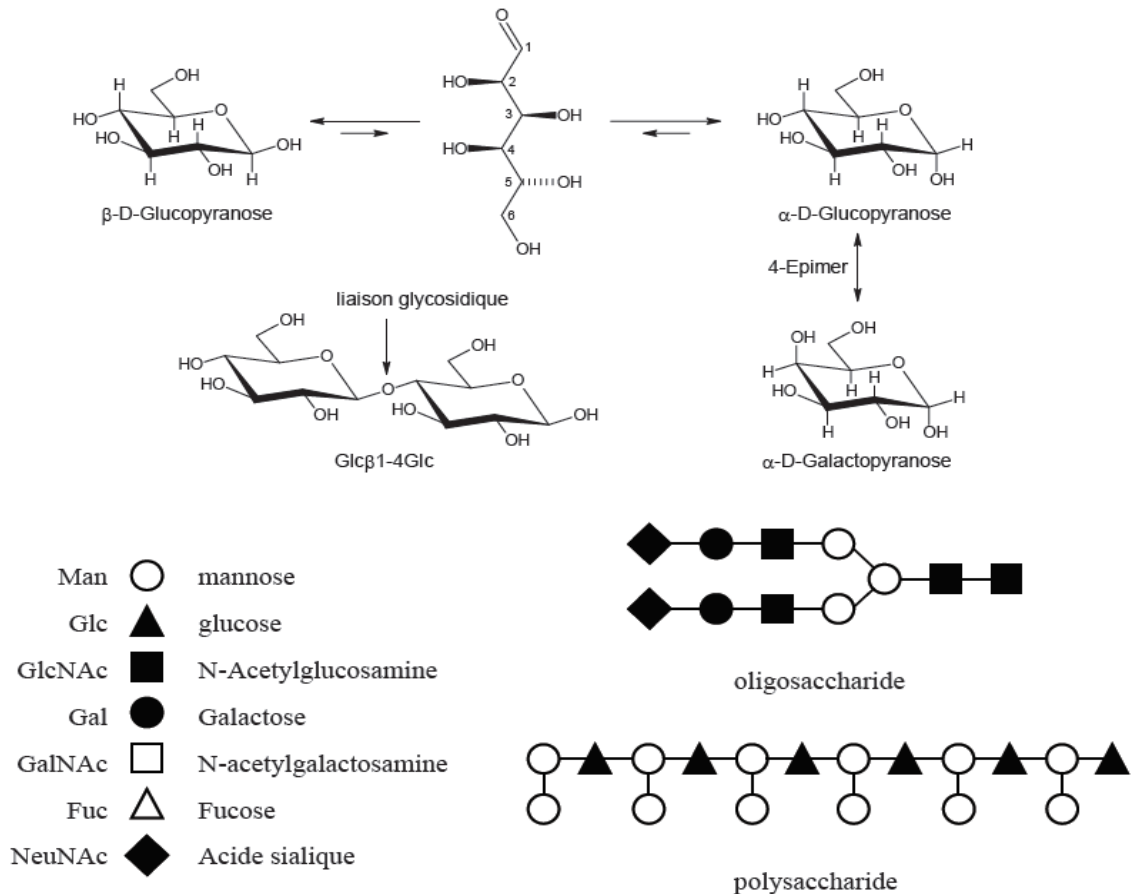
Notre hypothèse de travail concerne les modulations du statut protéique des cellules tumorales et en particulier les glycoprotéines sécrétées ou membranaires qui jouent un rôle fondamental dans le processus métastatique qui accompagnent les transformations malignes.

Cette étude est réalisée dans une approche quantitative par la détermination de la concentration des glycoprotéines évalué par les dosages des mucoprotéines, du fucose et de l'acide sialique qui sont des constituants fondamentaux des parties glycaniques des glycoprotéines chez une population de patients ayant des pathologies tumorales avec et sans métastases. Dans une autre approche qualitative on a étudié les parties glycaniques des glycoprotéines des intégrines  $\alpha3\beta1$  des lignées cellulaires tumorales du colon par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour identifier les structures glycaniques impliquées dans la migration cellulaire et l'apparition de métastase.

## ***EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE***

## 1. Les glucides et glycoconjugués

Les glucides présentent la plus importante complexité, surtout en termes de variations structurales qui n'a pas d'égale dans les autres classes de polymères biologiques. Du point de vue chimique, les sucres sont des polyhydroxy-cétones ou polyhydroxy-aldéhydes. Les monosaccharides ont une formule générale du type  $C_xH_{2x}O_x$  avec un nombre d'atomes de carbone de la chaîne principale qui peut varier de trois à dix unités. Une caractéristique générale des sucres est que l'un des atomes de carbone porte une fonction cétonique ou aldéhydique. Pour les structures à cinq (pentoses) et six atomes de carbone (hexoses), la condensation intramoléculaire est à l'origine de la structure cyclique (furanose ou pyranose) qui est la forme prédominante en solution. La cyclisation donne naissance à un nouveau centre chiral dans la molécule, le carbone anomère C1, qui peut avoir deux configurations appelées  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ce carbone anomère peut se condenser avec un des hydroxyles d'un deuxième monosaccharide pour donner un disaccharide. Ainsi, l'addition de monomères donne lieu à la formation de structures dont la complexité augmente considérablement avec le nombre de résidus. Les structures les plus simples, linéaires ou branchées, sont formées par l'addition de deux à cinq monomères et sont nommées en utilisant les préfixes di-, tri-, tetra- et pentasaccharides. Le terme oligosaccharides, concerne des molécules qui contiennent une vingtaine de monosaccharides. Les polysaccharides quant à eux, renferment plus de 20 résidus et présentent une structure plus complexe. (Figure 1).



**Figure 1:** Structure des glucides, oligosaccharides et polysaccharides.

## 1.2 Relations structure-fonction

Les glucides présentent un potentiel important et exclusif qui résulte de leurs capacités à créer des structures de grande complexité, incluant des points de ramification à partir des simples monomères. Par exemple un simple monosaccharide comme le glucose peut se lier par son carbone anomère (de façon  $\alpha$  ou  $\beta$ ) avec les cinq hydroxyles d'un deuxième glucose, donnant naissance à onze isomères structuraux différents. Par contre, deux acides aminés différents peuvent se lier seulement de deux façons différentes. Les variations structurales engendrées par un tel type de molécules sont énormes. La structure des glycanes (oligosaccharides, glycoconjugués, polysaccharides) dépend donc fortement de leur composition. Par ailleurs, la présence des liaisons glycosidiques induit une flexibilité structurale et conformationnelle considérable. La conséquence directe de cette variabilité structurale est la grande diversité dans leurs rôles et leur localisation dans les organismes vivants permettant le renforcement structural, l'accumulation d'énergie, la reconnaissance moléculaire, la croissance, le développement, la défense, l'ancrage et le ciblage.

### **1.3 La glycosylation cellulaire**

Les glycannes couvrent la surface de toutes les cellules composant un organisme multicellulaire ayant la capacité de se différencier et de former des tissus<sup>[14]</sup>. La glycosylation est une modification essentielle des protéines et des lipides chez les levures et les eucaryotes supérieurs. Elle affecte la résistance à la protéolyse, la solubilité, la stabilité, la structure et le turnover des protéines ainsi que leur immunogénicité<sup>[15]</sup>. Elle reste l'évènement post-traductionnel principal et le plus complexe de la maturation des protéines. La glycosylation consiste en une succession de réactions enzymatiques se déroulant chez les eucaryotes principalement dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi. La partie glycosylée de la glycoprotéine module non seulement ses propriétés physico-chimiques mais possède également des fonctions spécifiques dans la cellule, telles que les interactions ligand-récepteur ou encore le contrôle de la qualité du repliement des protéines<sup>[16]</sup>.

Les glycosyltransférases font preuve par leurs nombreux substrats, d'une très grande diversité fonctionnelle. Elles catalysent la liaison covalente de mono- ou polysaccharides sur différents substrats, en des sites bien définis. L'examen des banques de données suggère que 70% des protéines sont potentiellement des cibles de la glycosylation<sup>[17]</sup>. Concernant les lipides, plus de 200 structures glycaniques différentes ont été identifiées<sup>[18]</sup>.

### **1.4 La glycopathologie**

L'importance biologique des glycannes en pathologie peut se définir à trois niveaux :

- Leurs modifications structurales et quantitatives qui sont à l'origine de diverses situations pathologiques.
- Les pathologies engendrées par des défauts génétiques de la glycosylation.
- Le devenir des glycannes, normalement exprimés par les tissus, comme cibles de réactions immunitaires.

Le premier point est illustré par le cancer. En effet, les glycanes des cellules tumorales subissent des modifications profondes<sup>[4]</sup>. Les conséquences fonctionnelles de ces altérations sont encore mal connues, mais il y a des éléments indiquant qu'elles permettent aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Par ailleurs, elles pourraient être responsables de la perte d'inhibition de contact et favoriseraient la prolifération. Il est important de noter que les cellules tumorales ne se mettent pas à exprimer des structures glycaniques anormales ; elles expriment le plus souvent des structures qui ne sont pas habituellement exprimées dans le tissu où la tumeur se développe et qui sont souvent des réminiscences de structures foetales. Leur étude structurale s'est avérée très fructueuse constituent des marqueurs diagnostiques, voire pronostiques de certains

cancers<sup>[19]</sup>. L'un des exemples le plus étudié est le disaccharide Gal $\beta$ (1,3)GalNAc- également appelé antigène de Thomsen-Friedenreich ou antigène TF, ou encore antigène T. Cet antigène n'est généralement pas exprimé par les cellules humaines normales car il est recouvert par un ou deux résidus d'acide sialique. En revanche, il constitue un marqueur important en cancérologie, car il est exprimé dans 85% des tumeurs affectant les tissus épithéliaux<sup>[20]</sup>. D'autre part, l'augmentation de l'expression de certains glycanes, notamment les épitopes sialyl-Lewis X (sLex) et sialyl-Lewis a (sLea) dans les cellules cancéreuses, augmente leur potentiel métastatique en raison de l'augmentation de leurs interactions avec les cellules endothéliales par le biais de la sélectine E<sup>[21]</sup>.

D'autres pathologies chroniques, comme l'arthrite rhumatoïde est un exemple où les glycanes semblent jouer un rôle important<sup>[22]</sup>. En effet, les patients atteints de cette maladie ont des immunoglobulines G (IgG) présentant une glycosylation anormale avec un défaut de galactosylation dans la région Fc, appelées formes IgG-G0, qui leur permet d'interagir avec le système du complément à travers la lectine « mannose-binding protein « MBP » du collagène. Ceci suggère que l'inflammation chronique de la membrane synoviale est causée par la présence des glycoformes IgG-G0 dans l'articulation affectée et de leur activation du complément<sup>[23]</sup>. Les niveaux d'activité des protéines MBP et IgG-G0 sont en corrélation avec le moment de l'apparition de la maladie<sup>[24]</sup>.

Le deuxième point concerne des syndromes où la glycosylation des glycoprotéines est altérée. Ces syndromes, appelés « Carbohydrate-Disorders of Glycosylation » (CDG), sont généralement caractérisés par une hypoglycosylation des glycoprotéines sériques<sup>[25]</sup>. Il s'agit de maladies génétiques relativement rares dont les causes ne sont pas encore totalement élucidées. Au moins seize formes de CDG ont été identifiées cliniquement, avec des altérations de la N-glycosylation. Les formes les plus sévères affectent lourdement le système nerveux central.

Si nous prenons en compte que la glycosylation est un événement post-traductionnel qui affecte les propriétés et les fonctions protéiques et lipidiques d'une cellule, il est aisé de comprendre pourquoi elle a un impact considérable sur de nombreux processus biologiques<sup>[2]</sup>. Ces dernières années en plus des altérations de la N-glycosylation, un large éventail de phénotypes liés à d'autres défauts de la glycosylation ont été incorporés aux CDGs, comprenant l'exostose multiple héréditaire<sup>[26]</sup>, le syndrome progéroïde<sup>[27]</sup> et les dystrophies musculaires<sup>[28]</sup>. Des centaines de gènes sont impliqués dans la construction des glycoconjugués<sup>[1]</sup>, ce qui suggère qu'un grand nombre de défauts potentiels dans les voies de biosynthèse peut mener à des situations pathologiques de type CDG.

Un autre point peut être mis en évidence dans les processus pathologiques déclenchés par les réactions immunitaires, en réponse à des structures glycaniques antigéniques externes, comme les organes transplantés ou certaines infections parasitaires.

Les cellules eucaryotes n'utilisent pas tout le répertoire quasi infini des structures glycaniques possibles, mais une partie restreinte seulement. En conséquence, la composition des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines ou des glycolipides dépend de l'espèce. Au sein d'une même espèce, elles dépendent du statut génétique de l'individu et pour un même individu, du type cellulaire et de son état de différenciation. Le fait que chaque type cellulaire exprime des spécificités de glycosylation qui lui sont propres indique que les glycannes sont des molécules pouvant moduler, voire spécialiser des fonctions biologiques importantes. Ceci est renforcé par le fait que la structure des glycannes se modifie au fur et à mesure que les cellules se différencient ou s'activent.

Cette spécificité de glycosylation est essentielle car elle détermine, en partie, l'identité cellulaire comme nous l'a amplement démontré l'immunologie. En effet, les structures moléculaires qui déterminent certains groupes sanguins, notamment le système ABO, sont de nature glucidique, indiquant qu'une partie du "soi" est constituée de saccharides. Cette notion d'un "soi" glycanique est renforcée par le fait que toute modification "accidentelle" des structures glycaniques exprimées à la surface des cellules peut déclencher un processus auto-immun. Par exemple, certains agents infectieux, comme le virus de la grippe, le trypanosome ou des bactéries comme *Clostridium perfringens* ou le streptocoque, expriment à leur surface ou secrètent une sialidase responsable d'hydrolyse de ces derniers démasquant des antigènes galactosylés normalement cryptés, ce qui a pour conséquence le déclenchement d'un processus autolytique car le sérum humain normal contient des anticorps naturels dirigés contre ces antigènes cryptés glycaniques<sup>[29]</sup>.

### **1.5 Les glycoconjugués**

Les glycoconjugués sont des molécules constituées d'une partie glucidique (mono- ou oligosaccharide) liée de manière covalente à une partie non glucidique (aglycone). Ce sont des composants essentiels des membranes cellulaires, de la matrice extracellulaire et des liquides biologiques et sont particulièrement importants dans la vie des organismes pluricellulaires. Selon la nature de la partie aglycone, on peut mettre en évidence trois classes différentes de glycoconjugués : les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycannes.

Un monosaccharide peut être lié en trois ou quatre positions différentes aux groupements hydroxyles des résidus voisins. La liaison entre deux monosaccharides peut former deux isomères,  $\alpha$ - et  $\beta$ -. Cette caractéristique distingue les saccharides du reste des macromolécules biologiques qui contiennent quasi exclusivement des structures linéaires. Ce système codant est essentiel pour

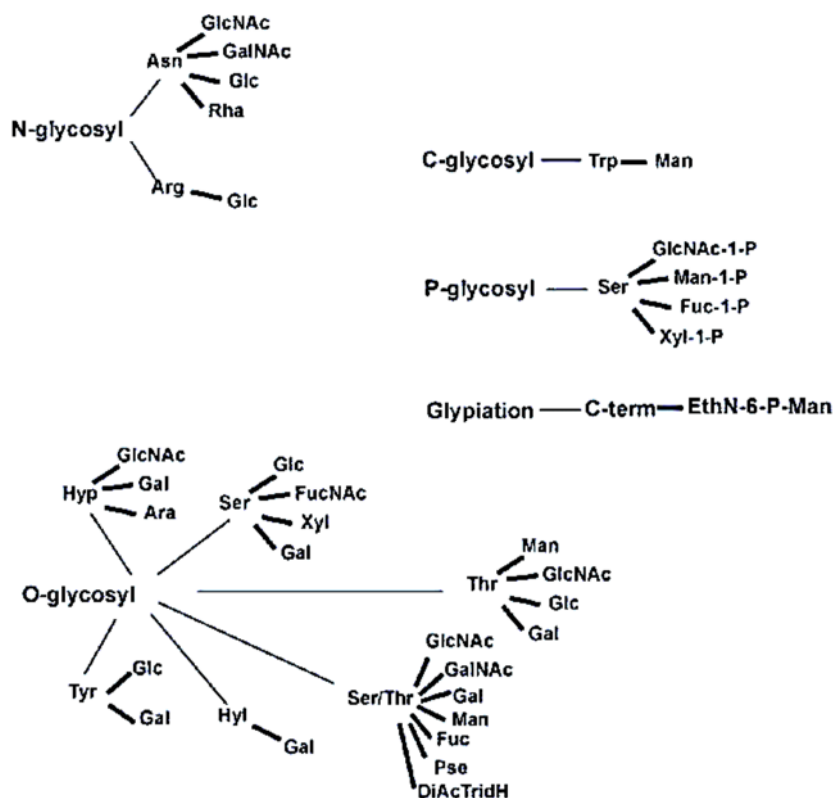


permettre aux cellules de communiquer avec efficacité et rapidité par le biais d'interactions complexes à la surface cellulaire. Tous les besoins structuraux pour former une panoplie de signaux avec un système de taille minimale sont réalisés grâce aux oligosaccharides<sup>[30]</sup>.

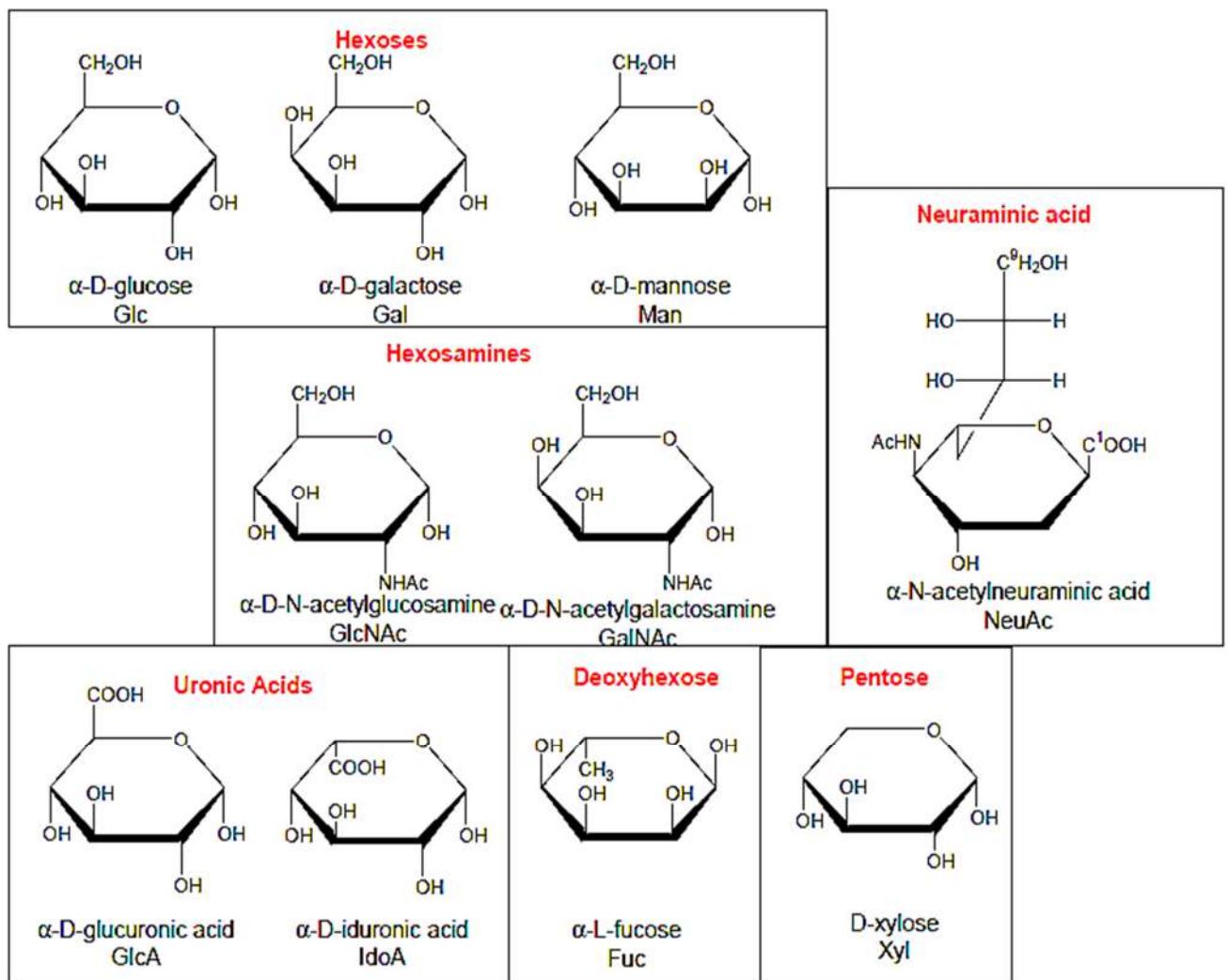
Les rôles biologiques des glycoconjugués sont divers et peuvent être groupés en propriétés structurelles et modulatrices ainsi que la reconnaissance spécifique grâce à d'autres molécules.

### 1.5.1 Les glycoprotéines

Aujourd'hui, une grande variété de liaisons peptide-saccharide a été décrite dans les glycoprotéines de presque tous les organismes vivants. Treize monosaccharides différents (Figure 3) et 8 types de résidus aminoacides participent à ces liaisons. Ainsi il existe 31 combinaisons saccharide-aminoacides différentes. Tenant compte de la configuration anomérique des liaisons glycosidiques, phosphoglycosyl, PIG phosphoéthanolamine, le nombre de liaisons serait moins de 41. Les saccharides attachés aux protéines peuvent être classés selon la nature de cette liaison entre eux. Ces liaisons sont au nombre de cinq. (Figure 2)



**Figure 2** : Les cinq différents types de liaisons saccharide-peptide identifiés. (Spiro 2002). C-term : résidu C-terminal ; Pse : acide pseudaminique ; Hyl : hydroxylysine ; Hyp : hydroxyproline ; P-glycosyl : liaison phosphoglycosidique ; Rha : rhamnose.



**Figure 3 :** Les différents types des monosaccharides des glycoprotéines.

## 1.5.2 Les différents types de glycosylation

### 1.5.2.1 La N-glycosylation

La N-glycosylation est la mieux connue et la plus répandue des formes de glycosylation. C'est une modification co- et post-traductionnelle qui débute dans le réticulum endoplasmique (RE) et qui se poursuit dans l'appareil de Golgi. La liaison sucre-protéine implique la fonction héli-acétalique d'un résidu de GlcNAc et la fonction amide d'un résidu d'asparagine (Asn). Le site de N-glycosylation est localisé au niveau d'une séquence consensus « Asn-X-Ser/Thr » (X désignant n'importe quel acide aminé autre que la proline), appelée aussi séquen<sup>[31][32][33]</sup>.

Les caractéristiques de la N-glycosylation sont :

- l'utilisation du dolichyl-pyrophosphate (Dol-PP) comme support pour l'assemblage de l'oligosaccharide.
- le transfert en bloc du Glc3Man9GlcNAc2 seulement après terminison de la biosynthèse des protéines.
- la reconnaissance des résidus asparagine (Asn) caractérisé par la séquence Asn-X-Ser/Thr, hautement conservée chez les eucaryotes.

Les N-glycannes sont engagés dans une large panoplie de fonctions tissulaires et cellulaires. Ils participent :

- Au contrôle de qualité des protéines synthétisées dans le RE<sup>[34]</sup>.
- Au trafic intracellulaire de certaines glycoprotéines le long de la voie de sécrétion<sup>[35]</sup>.
- A la localisation lysosomale des hydrolases acides<sup>[36]</sup>.
- Au ciblage membranaire de certaines protéines dans les cellules polarisées<sup>[37]</sup>.
- Aux signaux de reconnaissance sur la surface cellulaire<sup>[38]</sup>.
- A la morphogenèse et au développement<sup>[38]</sup>.

### 1.5.2.2 La O-glycosylation

La O-glycosylation est une modification exclusivement post-traductionnelle dans laquelle la liaison protéine-sucre, de type acétalique, résulte de la condensation de la fonction hémiacétalique d'un monosaccharide avec la fonction alcool d'un acide aminé hydroxylé. Chez les mammifères, on compte essentiellement huit types d'O-glycosylation (Tableau 1).

**Tableau 1** : Principaux noyaux des chaînes O-glycanniques de type mucine. (Tian et al., 2009 ; Fukuda, 2002 ; Hanisch, 2001).

Noyau (Core)	Structure
Core 1 ou antigène T	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 2	GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 3	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 4	GlcNAc $\beta$ 1-6(GlcNAc $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 5	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 6	GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 7	GalNAc $\alpha$ 1-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Core 8	Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Antigène Tn	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Antigène Sialyl-Tn	Sia $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr

- Le type mucine (O-GalNAc). C'est le plus répandu. La O-glycosylation de type mucine implique l'association d'un résidu de GalNAc à un résidu de Ser/Thr par le biais d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique. Elle est retrouvée dans de nombreuses glycoprotéines, qu'elles soient membranaires ou circulantes, mais surtout chez un groupe de glycoprotéines de haut poids moléculaire produites au niveau des sécrétions épithéliales exocrines : les mucines<sup>[39]</sup>.

- Le type O-GlcNAc. Egalement ubiquitaire, ce type de O-glycosylation met en jeu une liaison de type O- $\beta$ -glycosidique entre un résidu de GlcNAc et un résidu de Ser/Thr essentiellement au niveau des protéines cytosoliques et nucléaires. C'est une modification particulière puisque d'une part, la copule glucidique n'est constituée que d'un monosaccharide le GlcNAc et d'autre part, la liaison O-glycosidique est transitoire et réversible si bien que la O-N-acétylglucosaminylation est en équilibre avec les processus de phosphorylation<sup>[40]</sup>.

- Le type protéoglycane (O-Xyl). Caractérisé par l'association covalente de très longs polysaccharides polychargés linéaires, les glycosaminoglycannes (GAG) avec l'axe peptidique d'une classe particulière d'une protéine pour donner les protéoglycannes. Ceux-ci ont un haut poids moléculaire et sont les composants essentiels de la matrice extracellulaire et de la lame basale de la plupart des tissus conjonctifs<sup>[41]</sup>. Cette association implique une liaison O- $\beta$ -glycosidique entre un résidu de Xyl et un résidu de Ser. Les chaînes de GAG sont constituées d'un noyau tétrasaccharidique linéaire conservé GlcUA( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Xyl( $\beta$ 1-O)Ser, prolongé par un nombre variable d'unités disaccharidiques linéaires HexAU-HexNA-R (Hexosamine, Acide uronique-HexosamineNacetyl), sulfatées ou non.

- Le type collagène (O-Gal). Il est retrouvé uniquement au niveau de glycoprotéines fibreuses. Les collagènes sont des constituants essentiels de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs. Ce type d'O-glycosylation résulte de l'association covalente par le biais d'une liaison O- $\beta$ -glycosidique, d'un résidu de Gal avec un résidu d'acide aminé particulier, l'hydroxylysine (hLys). Ce dernier est formé de manière post-traductionnelle, par action de la lysyl hydroxylase sur les molécules de précollagène. La copule glucidique est constituée soit de Gal seul, soit du disaccharide Glc( $\alpha$ 1-2)Gal<sup>[42]</sup>.

- Le type O-Man. Retrouvé dans un nombre limité de glycoprotéines du système nerveux, du muscle squelettique de mammifères comme l' $\alpha$ -dystroglycane et du plasma sanguin comme l'IgG 2, chez laquelle la copule glucidique est réduite au résidu de Man<sup>[43]</sup>. La O-mannosylation résulte de l'association covalente par le biais d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique d'un résidu de Man avec un résidu de Ser/Thr.

- Le type O-Fuc. Localisé au niveau des domaines répétés EGF (epidermal growth factor) et TSR (thrombospondine 1-repeats) de quelques glycoprotéines fibrinolytiques, comme l'activateur du plasminogène tissulaire ou encore les facteurs de coagulation VII et XII et de certains récepteurs membranaires de la famille Notch, impliqués dans des processus développementaux majeurs chez les mammifères, comme la myogénèse<sup>[44]</sup>. La O-Fuc résulte d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique entre un résidu de Fuc et un résidu de Ser/Thr.

- Le type O-Glc. Retrouvé au niveau des glycoprotéines impliquées dans des processus développementaux comme le récepteur Notch 1, ou encore la protéine Z humaine impliquée dans la fécondation et des domaines répétés EGF de glycoprotéines fibrinolytiques<sup>[45]</sup>. Ce type de glycosylation met en jeu une liaison O- $\beta$ - glycosidique entre un résidu de Glc et un résidu de Ser/Thr. La O-glycosylation est également retrouvée dans une protéine participant à la biosynthèse du glycogène, la glycogénine, où la liaison protéine-sucre de type O- $\alpha$ -glycosidique résulte de l'association covalente d'un résidu de Glc avec un résidu de tyrosine (Tyr).

Contrairement à la N-glycosylation, il n'existe aucune séquence consensus stricte pour la plupart des types de O-glycosylation, à l'exceptions de type O-Glc et O-Fuc<sup>[45]</sup>.

### 1.5.2.3 La C-glycosylation

La C-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui résulte de l'association covalente d'un résidu de mannose avec un résidu de tryptophane (Trp) par le biais d'une liaison « carbone-carbone » entre l'atome de carbone en position 1 du résidu de Man et l'atome de carbone en position 2 du noyau indole du résidu de Trp<sup>[46]</sup>. La liaison protéine-sucre n'est pas une liaison glycosidique proprement parlé et la copule glucidique est réduite au résidu d' $\alpha$ -Man. Des expériences de mutagenèse dirigé ont pu montrer que la séquence consensus de C-mannosylation est de type « Trp-Xxx-Xxx-Trp » (Xxx étant n'importe quel acide aminé), le résidu de Trp N-terminal étant celui engagé dans la liaison avec le résidu de Man<sup>[47]</sup>. La C-mannosylation intéresse un nombre limité de glycoprotéines, comme la RNase 2, l'interleukine 12 (IL-12) et d'autres glycoprotéines possédant des domaines répétés de type TSR, comme la thrombospondine de type 1 qui est également O-fucosylée et certains facteurs du complément. (Annexe : 4 ; Tableau : 25)

## 1.6 Structures des chaînes glycaniques des glycoprotéines

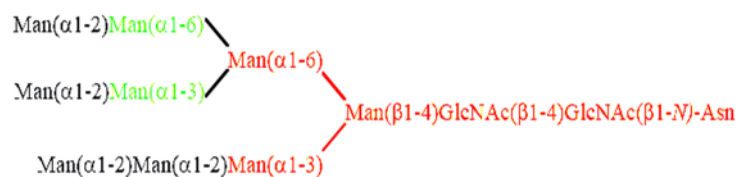
### 1.6.1 Structure des N-glycannes

Les N-glycannes sont caractérisés par un noyau pentasaccharidique commun, le noyau trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) et conservé quel que soit l'espèce. Ce noyau est caractérisé par la présence d'un point de branchement au niveau d'un résidu de β-Man donnant naissance à deux branches : les branches (α1-3)- et (α1-6)-mannosidique.

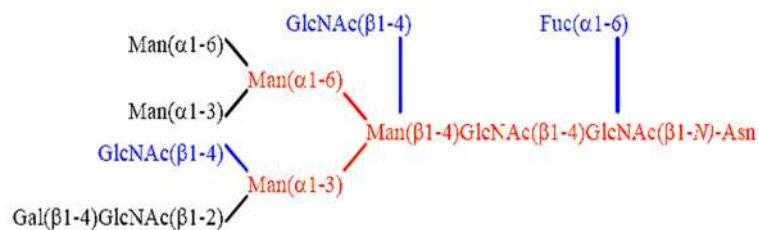
En fonction de la nature des antennes qui substituent ce noyau au niveau de chacune de ces branches mannosidiques, les N-glycannes sont subdivisés en trois groupes : le type complexe, le type oligomannosidique et le type hybride [32].

Les N-glycannes de type complexe ne renferment que trois résidus de Man, ceux du noyau pentasaccharidique possèdent des antennes constituées par deux à quatre résidus de GlcNAc, pour donner respectivement les structures dites bi-, tri- et tétraantennées (Figure 4).

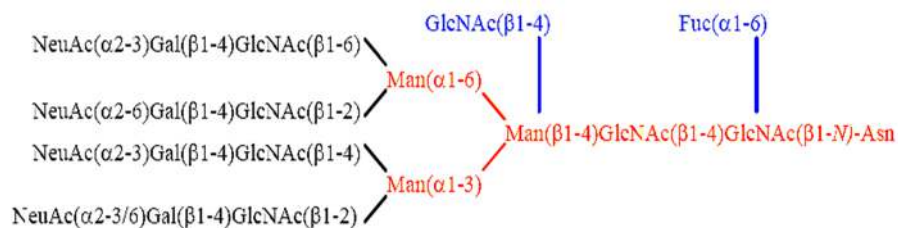
#### N-glycane de type oligomannosidique :



#### N-glycane de type hybride :



#### N-glycane de type complexe :



**Figure 4** : Type d'assemblage des glycoprotéines.(Kornfeld R & Kornfeld S Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 1985 ; 54 : 631-64)

Le résidu de  $\beta$ -Man du noyau pentasaccharidique peut également être substitué par un résidu de GlcNAc dit intercalaire mais ne constitue pas une antenne. Les résidus de GlcNAc antennaires peuvent être substitués en position 3 ou 4 par des résidus de Gal pour former respectivement des chaînes N-acétyllactosaminiques ou LacNAc Gal( $\beta$ 1-3/4)GlcNAc-R de type 1 ou de type 2. Chez l'homme, l'expression des chaînes LacNAc de type 1 est mineure et restreinte aux tissus épithéliaux, tandis que les chaînes LacNAc de type 2 sont ubiquitaires. Les résidus de GlcNAc antennaires peuvent également être substitués en position 4 par des résidus de GalNAc, pour former des chaînes N,N'-diacétyllactosaminiques ou LacdiNAc GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R. (Figure. 5). Les résidus de Gal distaux des antennes LacNAc sont souvent substitués en ( $\alpha$ 2-3/6) par des résidus de NeuAc, ou plus rarement, par des acides polysialiques [NeuAc( $\alpha$ 2-8)], comme c'est le cas pour les molécules d'adhésion du système nerveux (N-CAM) [48].

La sialylation est plus fréquente en ( $\alpha$ 2-3), compte tenu des multiples activités des ( $\alpha$ 2-3)-sialyltransférases (ST3- Gal) qui sont ubiquitaires. Par contre, la sialylation en ( $\alpha$ 2-6) est moins fréquente et les enzymes chargés de cette synthèse (ST6-Gal I et II) sont exprimés que dans certains types cellulaires, comme le foie et la glande mammaire où elles constituent les principales sialyltransférases.

Le résidu de GalNAc des chaînes LacdiNAc peut être sialylé en ( $\alpha$ 2-6) ou substitué en position 4 par un résidu de sulfate, comme c'est le cas de bon nombre de glycohormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et gonadique, telles que la « thyrotrophin-stimulating hormone » (TSH) ou encore la « follicle-stimulating hormone » (FSH)[49]. En revanche la sulfatation des antennes de type 1 et de type 2 peut être réalisée

- Soit en positions 3/4/6 des résidus de GlcNAc internes et subterminaux.
- Soit en positions 3/6 des résidus de Gal distaux.
- Soit, plus rarement, sur en position 3 du résidu de GlcNAc proximal.

Enfin, les antennes LacNAc peuvent respectivement être substituées en ( $\alpha$ 1-2) et ( $\alpha$ 1-3/4) sur des résidus de Gal distaux et de GlcNAc internes ou subterminaux par des résidus de Fuc pour former les déterminants antigéniques à activités de groupe sanguin de type Lewis (Le) et de type ABH[50] (Tableau : 2).

Par ailleurs, la fucosylation peut également avoir lieu en ( $\alpha$ 1-6) sur le résidu de GlcNAc proximal. Les N-glycannes de type oligomannosidique possèdent des antennes exclusivement constituées de résidus d' $\alpha$ -Man et peuvent renfermer de quatre à neuf résidus de Man (Man4GlcNAc2 à Man9GlcNAc2 ou Man4-9GlcNAc2).

**Tableau 2** : Structure des principaux motifs glycaniques d'antigènes tissulaires identifiés chez l'homme. (Muchmore et al, 1987 ; Gold & Sochat, 1989 ; Lo-Guidice et al, 1994)

Antigène	Structure	
	Type 1	Type 2
i		Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β
I		Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β
H1/H2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α
Le <sup>a</sup> /Le <sup>x</sup>	Fuc α—GlcNAc β   Gal β	Gal β—GlcNAc β   Fuc α
Le <sup>b</sup> /Le <sup>y</sup>	Fuc α—GlcNAc β   Gal β   Fuc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α    Fuc α
A1/A2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α   GalNAc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α   GalNAc α
B1/B2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α   Gal α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α   Gal α
T		Gal β—GalNAc α-O-Ser/Thr
Tn		GalNAc α-O-Ser/Thr
Sialyl-Tn		NeuAc2α—GalNAc α-O-Ser/Thr

Enfin, les N-glycannes de type hybride possèdent des séquences oligomannosidiques au niveau de la branche (α1-6)-mannosidique, et des séquences complexes au niveau de la branche (α1-3)-mannosidique (Figure 4). Ces structures présentent fréquemment un résidu de GlcNAc intercalaire et peuvent être fucosylées en (α1-6) sur le résidu de GlcNAc proximal. La composante oligomannosidique peut être formée d'un à quatre résidus de Man. Elle peut être constituée d'une ou de deux antennes formées d'une unité LacNAc de type 2 ou LacdiNAc pouvant être sialylée ou sulfatée. Des déterminants antigéniques de type ABH présentent des glycannes de type hybride (Tableau 2).





**Figure 5 :** Structure des principaux motifs antigéniques communs aux N- et O-glycannes.  
(Marionneau *et al.*, 2001 ; Orczyk-Pawilowicz, 2007)

### 1.6.2 Structure des O-glycannes de type mucine

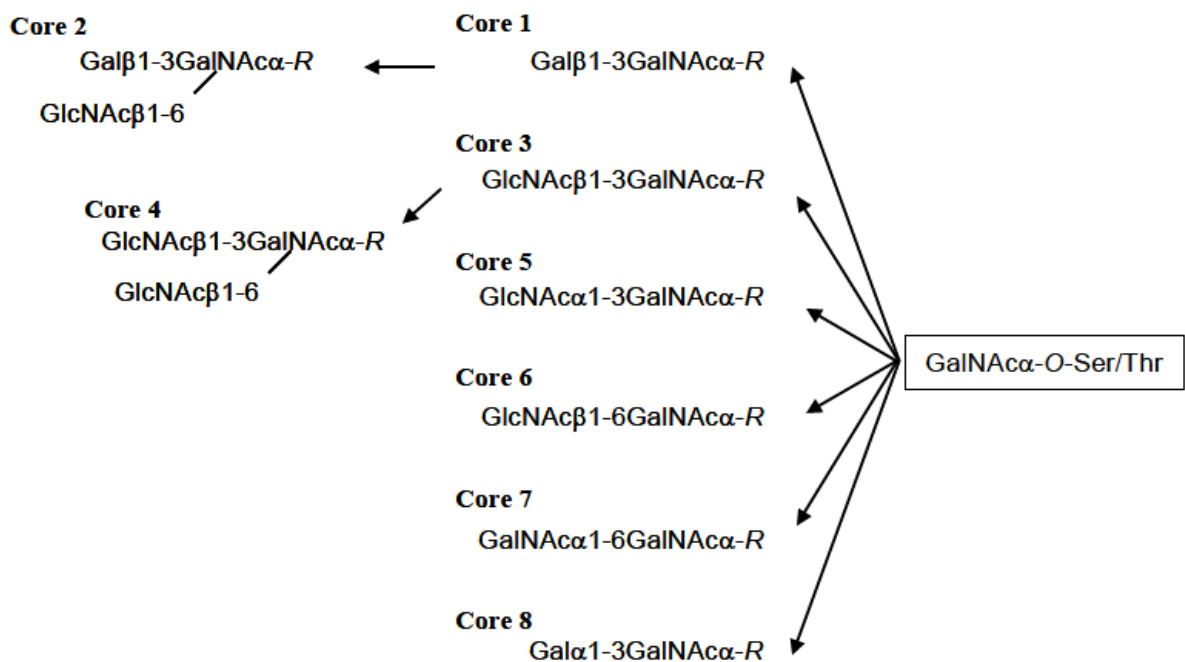
A la différence des N-glycannes, les O-glycannes sont caractérisés par l'existence de huit noyaux<sup>[51]</sup> (Figure 6). Les 4 premiers noyaux sont les plus importants. Chez la plupart des mammifères, le noyau 1 constitue le déterminant antigénique de Thomsen-Friedenreich (dit antigène T) et le noyau 2 ont une distribution ubiquitaire et entrent aussi bien dans la composition des mucines que dans celle des autres types de glycoprotéines qu'elles soient membranaires ou sécrétées. Le noyau 7 est le seul qui n'ait jamais été décrit chez l'homme. Les noyaux 3 et 8, quant à eux, sont exclusivement retrouvés au niveau des mucines des tractus gastrointestinal, respiratoire et reproductif.

Hormis ces huit noyaux, l'antigène Tn GalNAc(α1-O)Ser/Thr ainsi que sa forme sialylée et l'antigène sialyl-Tn NeuAc(α2-6)GalNAc(α1-O)Ser/Thr peuvent être retrouvées à la surface de certaines glycoprotéines et mucines (Figure 6). Le noyau 1 ou antigène T est essentiellement retrouvé

sous forme monosialylée NeuAc( $\alpha$ 2-3/6)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-R ou bisialylée NeuAc( $\alpha$ 2-6)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc-R (Figure :8). Le noyau 3 peut également être sialylé en ( $\alpha$ 2-6).

Par ailleurs, contrairement aux N-glycannes de type complexe avec lesquels ils partagent la quasitotalité des caractéristiques structurales, les O-glycannes sont très hétérogènes. En effet, chacun des noyaux peut être substitué par divers motifs saccharidiques (GlcNAc et Gal) pour former des antennes LacNAc de type 1 et de type 2, fréquemment sialylées en ( $\alpha$ 2-3) ces antennes peuvent également être galactosylées en ( $\alpha$ 1-3) comme celle du type complexe des N glycannes.

Les chaînes LacdiNAc sont absentes des O-glycannes. La figure 8 montre les nombreuses possibilités de structure pouvant être formées à partir des noyaux 1 à 4 qui sont les plus couramment rencontrés. Les antigènes i/I peuvent prendre naissance au niveau des noyaux 2 et 4 comme les N-glycannes tri- et tétraantennés, présentent une branche ( $\beta$ 1-6)-N-acétylglucosaminyl favorable à la formation de séquences polyLacNAc. Les déterminants antigéniques de groupe sanguin ABH, Sda/Cad peuvent également être formés à partir d'antennes de type 1 et de type 2 et d'antennes polyLacNAc linéaires ou branchées (i/I).



**Figure 6:** Structures composites illustrant la diversité des séquences portées par les noyaux O-glycanniques. (Hounsell EF ; 1996).

### 1.6.3 Structure des glycannes des glycolipides

Le nom « glycolipide » décrit un glycoconjugué composé d'une partie saccharidique liée à une chaîne aglycone hydrophobe<sup>[52]</sup> peuvent être divisés en glyco-glycérolipides, abondants chez les bactéries et les plantes, et en glycosphingolipides (GSL) majoritaires chez les animaux. Ces derniers représentent l'un des trois principaux types de lipides associés à la membrane cellulaire. Les autres étant des phospholipides et le cholestérol. Les GSL sont classés en différentes séries selon la structure centrale (core) de leur chaîne saccharidique<sup>[53]</sup>. (Tableau 3)

**Tableau 3** : Noms et structures majeures du core des glycosphingolipides des vertébrés. Hakomori 1981 ; Kobata and Takasaki 1992.

Nom (série)	Structure core
Lacto	Gal $\beta$ 3GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Neolacto	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Globo	GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Isoglobo	GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Ganglio	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Muco	Gal $\beta$ 3Gal $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Céramide
Gala	Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 1Céramide

Les GSL ont été découverts en 1940. Il s'agit de substances enrichies en lipides présentes dans les tissus normaux et peuvent s'accumuler dans les tissus de malades atteints de pathologies de stockage tels que la maladie de Tay-Sachs. La plupart des glycolipides animaux contiennent une céramide hydrophobe et une chaîne oligosaccharidique hydrophile<sup>[54]</sup>. Des variations dans le type et le nombre de liaisons, ainsi que des modifications ultérieures des saccharides et des résidus d'acide sialique dans la chaîne oligosaccharidique ainsi que dans la partie lipidique, donnent naissance à une variété de GSL naturellement synthétisée<sup>[55]</sup>.

Les gangliosides représentent une partie des GSL qui est spécialement abondante dans les neurones. Ils contiennent un ou plusieurs résidus d'acide sialique dont l'addition est catalysée par des glycosyltransférases dans la lumière de l'appareil de Golgi<sup>[56]</sup>.

Les gangliosides sont des constituants fondamentaux pour les cellules. Ils auraient plusieurs fonctions biologiques comme la reconnaissance cellulaire, l'adhésion et la signalisation. L'expression des gangliosides est spécifique du type cellulaire et régulée au cours du développement, de la différenciation cellulaire et de la carcinogénèse<sup>[57]</sup>.

Des études récentes<sup>[58][59]</sup> suggèrent leur participation à la signalisation membranaire via des associations avec les protéines d'ancrage au PIG, les molécules de signalisation transductionnelles et les récepteurs des facteurs de croissance comme des plateformes permettant la fixation des protéines qui participent à la transduction du signal. Au cours du développement des neurones, il s'opère un changement des profils d'expression des gangliosides<sup>[60]</sup>. Chez l'Homme, les altérations génétiques des GSL ou le catabolisme des sphingolipides donnent lieu aux maladies de stockage lysosomal : les sphingolipidoses.

## 1.7 Fonctions des glycanes des glycoprotéines

Plus de 50% des protéines des mammifères sont glycosylées<sup>[61]</sup>. L'importance de la glycosylation a été démontrée au cours de nombreuses études<sup>[62][63]</sup> réalisées sur des lignées cellulaires mutantes de levures et de mammifères ou encore sur des modèles de souris « knock-out » (KO) porteuses d'erreurs métaboliques de la glycosylation qui ont montré que les glycanes des glycoprotéines peuvent moduler :

- Leurs propriétés physicochimiques, comme le repliement, la solubilité, la stabilité, l'oligomérisation et leur résistance vis-à-vis des protéases<sup>[64]</sup>. En raison de leur caractère hydrophile, les glycanes contribuent à augmenter la solubilité des protéines qui les portent et ainsi prévenir leur aggrégation. A titre d'exemple la déglycosylation de l'érythropoïétine (EPO) a pour effet de diminuer significativement sa solubilité<sup>[65]</sup>.

Des expériences de dépliement / repliement *in vitro*, réalisées sur un certain nombre de glycoprotéines ont révélés que le taux de protéines glycosylées repliées est de loin plus important que celui de leurs formes non glycosylées<sup>[66]</sup>. Au cours du mécanisme de repliement protéique, les formes non glycosylées s'aggrègent au niveau de leurs surfaces hydrophobes. Quant aux protéines glycosylées, les glycanes contracteraient des liaisons hydrogène avec la chaîne protéique et aideraient donc au repliement de la chaîne protéique en stabilisant certaines structures secondaires.

Les glycanes jouent un rôle important dans la protection des glycoprotéines contre les attaques de protéases en masquant les sites potentiels de clivage par les protéases exposés à la surface<sup>[67]</sup>. Par exemple la RNase pancréatique porcine était beaucoup plus sensible aux activités protéolytiques de la trypsine et de la subtilysine sous sa forme déglycosylée. Leur élimination est essentiellement réalisée au niveau du foie par des récepteurs lectiniques aux asialoglycoprotéines connus également sous le nom de « récepteurs d'Ashwell »<sup>[68]</sup>. En effet, ce type de récepteurs semble reconnaître des glycoprotéines portant des N- et O-glycanes terminés par des résidus de Gal ou de GalNAc, bien qu'une étude récente révèle qu'ils sont capables de reconnaître des structures sialylées<sup>[69]</sup>. Ainsi, la

forme désialylée de l'EPO, bien que potentiellement très active, a une demi-vie considérablement réduite comparée aux glycoformes sialylées.

- Leurs propriétés biologiques, grâce à leur capacité d'interagir avec les lectines<sup>[70]</sup> et de moduler les interactions moléculaires par leur encombrement stérique. Elles peuvent moduler de manière variable et contrastée l'activité biologique des glycoprotéines, selon leur configuration structurale par rapport aux sites protéiques impliqués dans la fonction biologique. Ils peuvent contracter diverses liaisons hydrogènes et/ou électrostatiques avec les structures secondaires de la chaîne protéique et par conséquent stabiliser localement la conformation protéique et maintenir donc la structure de sa configuration active. A l'inverse, la présence de glycannes peut diminuer l'affinité d'un enzyme pour son substrat par effet stérique. C'est le cas de l'activateur tissulaire du plasminogène, impliqué dans la conversion du plasminogène en plasmine dans la fibrinolyse et dont la désialylation ou la déglycosylation partielle conduit à une augmentation significative de son activité enzymatique<sup>[71]</sup>. De manière générale, les N-glycannes modulent négativement l'activité des enzymes et notamment, leur affinités pour leurs substrats. Ils jouent aussi un rôle dans le maintien de la solubilité et de la conformation des enzymes. À l'inverse, les O-glycannes (type mucine), influent positivement l'activité de ces enzymes en augmentant leurs vitesses et leur affinités pour leurs substrats<sup>[72]</sup>.

- Leurs propriétés antigéniques. Les glycannes peuvent moduler les propriétés immunologiques d'une glycoprotéine en agissant comme masques cryptiques de sites protéiques antigéniques. C'est le cas des mucines, dont la région protéique poly-O-glycosylée renferme un certain nombre de motifs antigéniques masqués par les O-glycannes. C'est le cas d'un certain nombre de ligands microbiens reconnus par un groupe de récepteurs lectiniques les « Toll-like receptors » (TLR), présents au niveau de la membrane des macrophages et des cellules dendritiques, et qui jouent un rôle de premier plan dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée<sup>[73]</sup>. Les N-glycannes présents sur les immunoglobulines (Ig) G jouent un rôle primordial dans la liaison avec les récepteurs des IgG (Fc-R) présents au niveau de la membrane des cellules phagocytaires<sup>[74]</sup>.

- Enfin, de part leurs complexités et leurs hétérogénéités, les glycannes constituent des signaux de reconnaissance spécifiques dans les phénomènes d'adhésion et de communication cellulaire qui sont mise en jeu au cours de l'inflammation, l'immunité, la reproduction et l'embryogénèse<sup>[75]</sup>. C'est le cas de l'activateur du plasminogène urinaire, pour lequel la O-fucosylation de ses domaines EGF est indispensable à l'activation de son récepteur<sup>[76]</sup>. A l'inverse, la présence des glycannes sialylés ou non sur certaines glycohormones telles que l'EPO<sup>[77]</sup>, la FSH<sup>[78]</sup> et la LH <sup>[79]</sup>, influent très négativement sur leur liaison avec leurs récepteurs. Par ailleurs, il a également été démontré que la

glycosylation influençait le type de signalisation transduite par un récepteur sans pour autant affecter sa liaison avec un ligand<sup>[80]</sup>. Cependant, bon nombre de récepteurs, incluant les récepteurs Notch et ceux des protéines de la famille des « transforming growth factors  $\beta$  » (TGF- $\beta$ ) voient leurs activités de transduction du signal modulées par O-fucosylation<sup>[81]</sup>.

Les glycanes présents à la surface cellulaire sont responsables de la plupart des interactions que la cellule peut contracter avec son environnement, à savoir avec la matrice extracellulaire, les anticorps, les virus, les bactéries ou encore les hormones peptidiques et les toxines<sup>[82]</sup>.

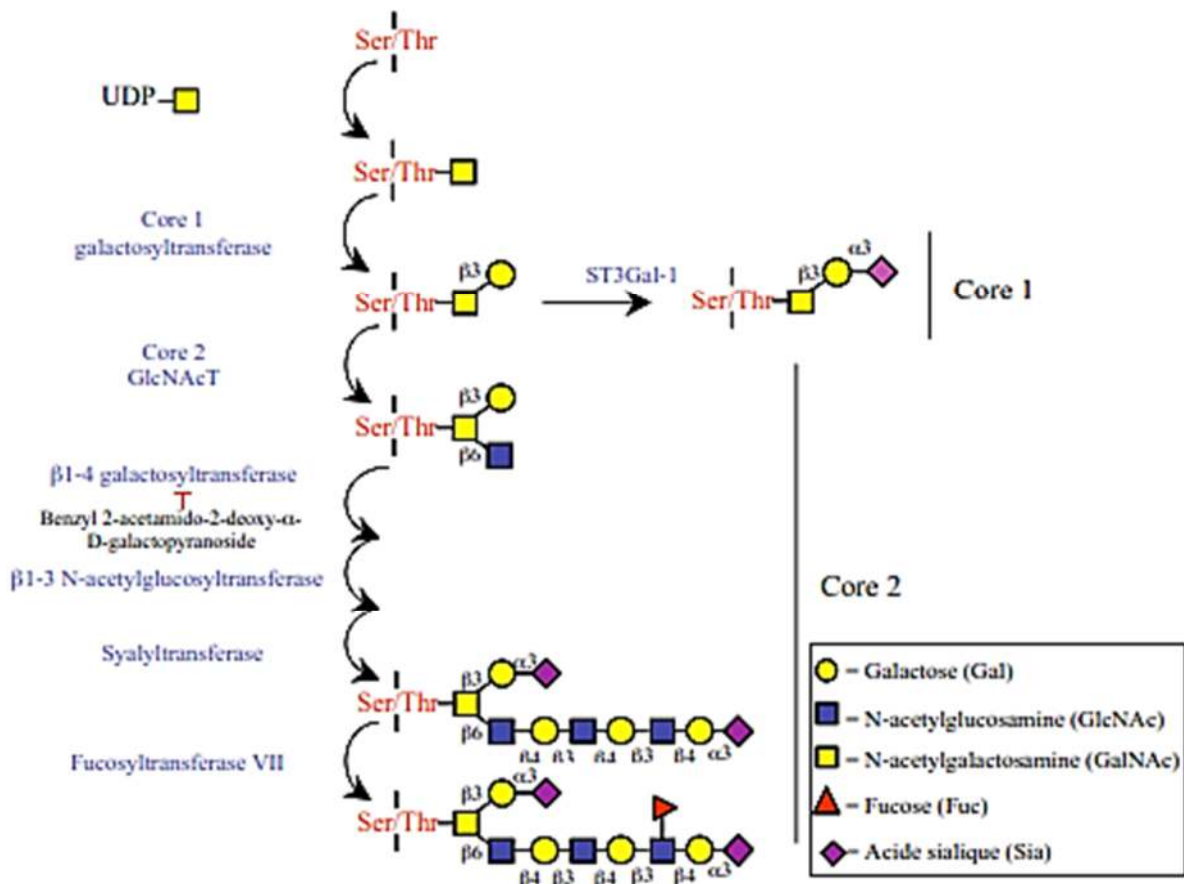
## 2. Biosynthèse des glycoprotéines

Les processus de biosynthèse des principales classes de glycanes se déroulent au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Ces derniers jouent un rôle déterminant dans le trafic intracellulaire, la maturation et la sécrétion des glycoprotéines<sup>[83]</sup>. La O-glycosylation de type O-GlcNAc (Figure 7) a lieu dans le cytosol et le noyau<sup>[84]</sup>. Au cours de leur cheminement dans la voie de sécrétion, les protéines nouvellement synthétisées sont co- et/ou post-traductionnellement glycosylées hormis celles qui résident dans le RE et l'appareil de Golgi, les autres sont adressées soit au lysosome (hydrolases acides), soit à la membrane plasmique (glycoprotéines membranaires), soit au milieu extracellulaire (glycoprotéines sécrétées) et ceci grâce à divers récepteurs lectiniques intracellulaires<sup>[85]</sup>.

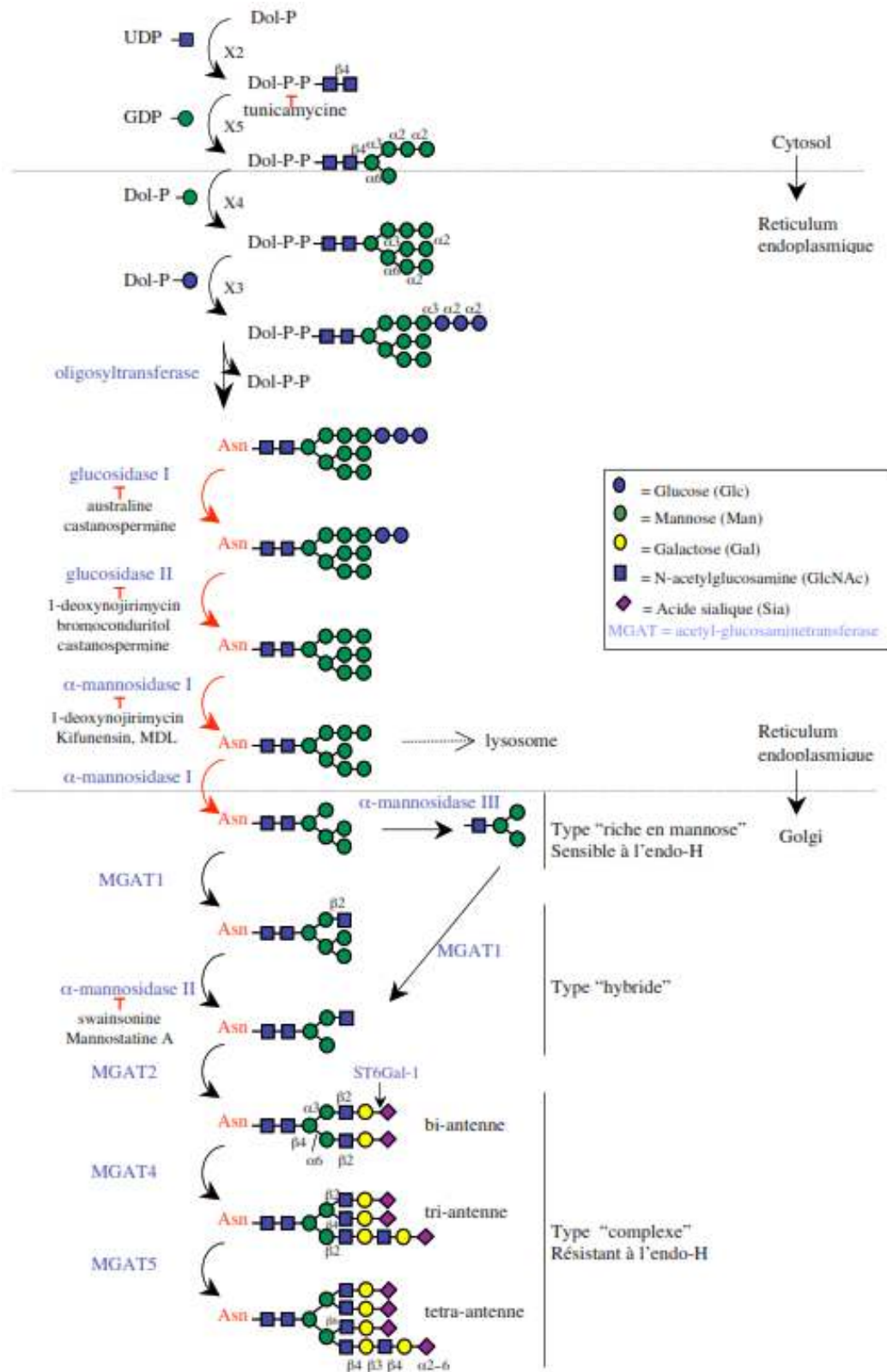
La N-glycosylation débute au niveau du RE par l'assemblage d'un précurseur tétradéca-saccharidique à un lipide polyisoprénique chargé, le pyrophosphodolichol (Dol-PP). Cette étape est suivie par le transfert Co-traductionnel et « en bloc » du complexe directement sur la chaîne protéique naissante, au niveau d'un de ses sites consensus « Asn-Xxx-Ser/Thr ». La maturation du tétradéca-saccharide N-lié sur les protéines consiste en l'élagage d'un certain nombre de résidus monosaccharidiques par les glycosidases réticulaires et golgiennes, suivi de l'addition de nouveaux résidus monosaccharidiques par les glycosyltransférases golgiennes.

La O-glycosylation est réalisée au niveau de l'appareil de Golgi à l'exception des types O-Man et O-Fuc, où le processus est initié au niveau du RE. Le type O-GlcNAc quant à lui est réalisé au niveau du cytoplasme. Elle débute par l'addition d'un monosaccharide directement au niveau des résidus d'acides aminés hydroxylés (Ser, Thr et hLys). L'addition séquentielle d'unités saccharidiques sur les accepteurs (protéines, Dol-P-P ou chaînes glycaniques en élongation) grâce aux glycosyltransférases qui requièrent la présence de donneurs monosaccharidiques activés (nucléotide-sucres/phosphodolichol-sucres).

Les glycosyltransférases sont des enzymes membranaires. Elles possèdent une spécificité très étroite pour le donneur de sucre activé, l'accepteur et le type de liaison glycosidique. Son activité catalytique peut être fortement influencée par la structure de la chaîne peptidique portant le site de glycosylation. L'activité de certaines glycosyltransférases requièrent la présence d'ions métalliques divalents et des modifications post-traductionnelles, telles que la N-glycosylation qui module leur activité catalytique, quant à la phosphorylation de leur domaine cytoplasmique, il module leur trafic intracellulaire golgien. Ce dernier est également dépendant d'un autre groupe de protéines spécialisées et organisées en un complexe, le complexe « conserved oligomeric Golgi complex » (COG)<sup>186</sup>. Il semble que ce complexe joue un rôle important dans le maintien de la morphologie de l'appareil de Golgi et le transport antérograde de certaines protéines golgiennes résidentes vers le compartiment approprié (Figure 8).



**Figure 7 :** Différentes voies de biosynthèse des structures de base (cores) des O-glycanes de type mucine. (Ajit Varki, Essentials of glycobiology, New York, 1999)



**Figure 8 :** Voies de biosynthèse des glycanes *N*-liés. (Ajit Varki, Essentials of glycobiology, New York, 1999).



La glycosylation dépend donc de plusieurs facteurs :

- Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes codant pour les principaux acteurs des processus de la glycosylation (glycosyltransférases, glycosidases de maturation, transporteurs et enzymes de synthèse des donneurs monosaccharidiques activés ...) ces mécanismes dépendent de la nature de l'organisme vivant, du stade de développement, du type cellulaire et de son statut fonctionnel (activation et différenciation cellulaire) qu'il soit normal ou pathologique.

- La disponibilité en substrats des réactions de glycosylation (donneurs de sucres activés et accepteurs), qui est également fonction du taux d'expression des transporteurs de nucléotide sucres et des enzymes ayant en charge leurs synthèses.

- La compartimentation cellulaire ou distribution des glycosyltransférases et des glycosidases au sein des compartiments cis-, médian et trans-golgiens.

- La compétition des glycosyltransférases pour l'accepteur durant l'élongation de la chaîne glycanique.

- Le microenvironnement de chaîne oligosaccharidique en élongation.

De plus, la structure de la chaîne peptidique portant le site de glycosylation peut affecter l'activité catalytique des glycosyltransférases et être responsable des différences d'hétérogénéité glycanique entre les glycoprotéines produites par le même type cellulaire et entre les sites de glycosylation d'une même glycoprotéine<sup>[87]</sup>

### **3. Catabolisme des glycoprotéines**

Le catabolisme des glycoprotéines de manière générale, concernant les glycoprotéines intracellulaires à demi-vie longue des principaux organites cellulaires, les glycoprotéines exogènes (circulantes) et celle de la membrane plasmique qui est réalisé au niveau des lysosomes<sup>[88]</sup>, par contre les glycoprotéines intracellulaires à demi-vie courte, comme les glycoprotéines mal conformées provenant du RE, sont prises en charge par un complexe protéolytique multienzymatique cytoplasmique, le protéasome<sup>[89]</sup>.

Le système de dégradation cytoplasmique protéasomale est dédié aux protéines cytosoliques à demi-vie courte (facteurs de signalisation cellulaire et de régulation de l'expression génique...), mais également aux glycoprotéines ayant échoués dans les processus de mise en conformation assistées par les lectines chaperonnes. En effet, afin d'éviter leur agrégation dans le RE, les glycoprotéines mal conformées subissent un premier élagage de leurs chaînes N-glycanniques pour mettre un terme aux

tentatives inutiles de mises en conformation. Cette étape suivi de leur rétro-translocation vers le cytoplasme afin d'être prises en charge par le protéasome dans le cadre de l'ERAD<sup>[90]</sup>.

On distingue quatre catégories de glycoprotéines destinées à être catabolisées au niveau du lysosome :

- Les glycoprotéines intracellulaires à demi-vie longue présentes dans les organites cellulaires.
- Les glycoprotéines accumulées dans les vésicules de sécrétion.
- Les glycoprotéines de la membrane plasmique.
- Les glycoprotéines exogènes des milieux extracellulaires et des sécrétions exocrines (mucus) et endocrines (plasma sanguin).

La première catégorie est acheminée au lysosome par un processus appelé macroautophagie<sup>[91]</sup>. Ce processus cellulaire consiste en la séquestration d'une partie de cytoplasme pouvant inclure un organite entier dans une vacuole appelée autophagosome.

Les glycoprotéines exogènes et membranaires sont acheminées vers le lysosome par hétérophagie ou endocytose, qui est la voie la plus connue<sup>[92]</sup>. Les glycoprotéines exogènes telles que les hormones, les facteurs de croissance ou encore les glycoprotéines du plasma sanguin peuvent être internalisées soit par un processus endocytique spécifique et régulé faisant intervenir des récepteurs membranaires spécifiques soit par un processus endocytique absorptif non spécifique et constitutif (pinocytose).

L'acidité qui règne dans le lysosome est propice à l'activité catalytique de certaine enzyme et à la dénaturation de leur substrat qui facilite leur action. La protéolyse implique une classe de protéases actives en milieu acide, les cathepsines, qui agissent de manière concertée sur les glycoprotéines pour former un mélange d'acides aminés et de dipeptides<sup>[93]</sup>.

De plus, la concentration des glycoprotéines dégradées, au niveau du cytoplasme est faible, comparée à celle des glycoprotéines sécrétées dégradées au niveau du lysosome. Ainsi, le catabolisme lysosomal des glycoprotéines constitue une part importante de l'homéostasie des processus de glycosylation des protéines, comme en témoignent les taux de morbidité et de mortalités importantes observées chez les sujets souffrant de déficits génétiques du catabolisme des glycoprotéines : les glycoprotéinoses.

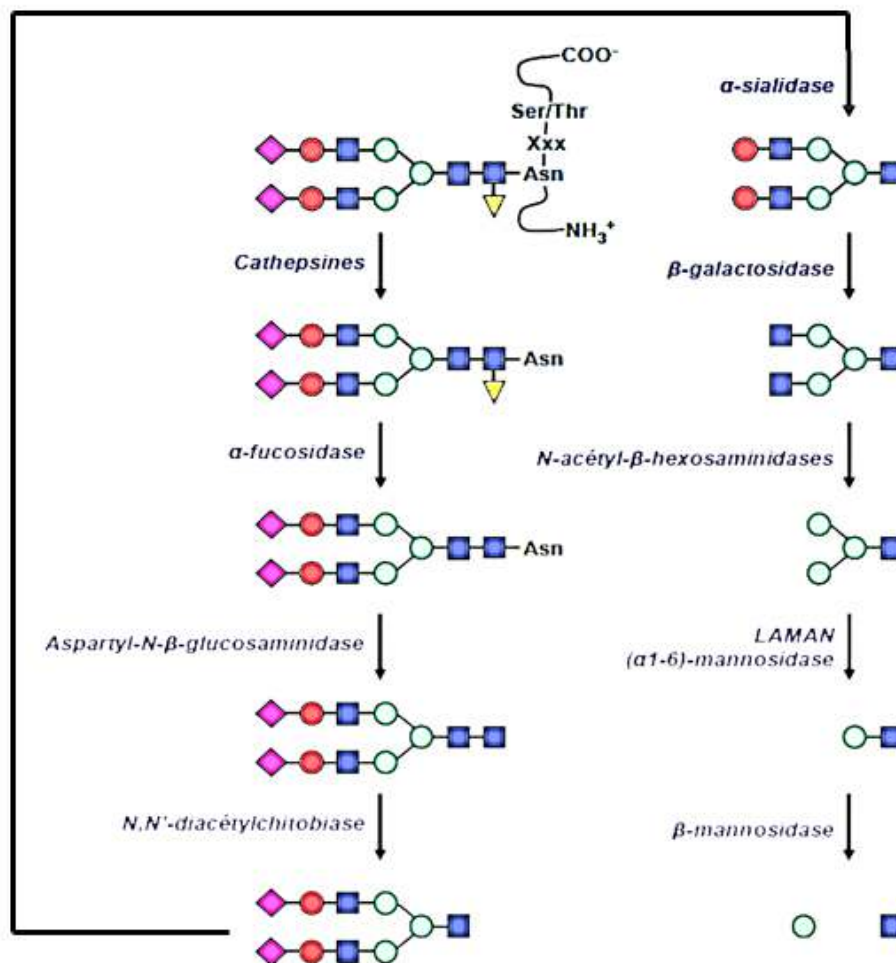
### 3.1 Dégradation des N-glycosylprotéines

La dégradation des N-glycosylprotéines est bidirectionnelle et implique la dégradation complète préalable de la chaîne peptidique par les cathepsines, suivie de la dégradation séquentielle des N-glycannes par les exoglycosidases, qui clivent les liaisons glycosidiques en s'attaquant au monosaccharide en position terminale non réductrice. L'activité des cathepsines ne requiert pas l'élimination préalable du glycanne et aboutit à la formation de glycoasparagines, ou N-glycosylasparagines. Ensuite, le résidu d'asparagine est éliminé par l'action d'une aspartyl-N- $\beta$ -glucosaminidase n'exerçant son activité de clivage de la liaison N-glycosidique que si les fonctions amine et carboxylique du résidu d'asparagine sont libres<sup>[94]</sup>. Cependant, il semblerait que l'activité de l'aspartyl-N- $\beta$ -glucosaminidase est nulle sur des glycoasparagines dont les N-glycannes renferment des résidus de Fuc liés en ( $\alpha$ 1-6) aux résidus de GlcNAc proximaux. Elle requiert en effet l'intervention d'une première exoglycosidase l' $\alpha$ -fucosidase, qui catalyse l'élimination des résidus de  $\alpha$ -Fuc qu'ils soient liés en ( $\alpha$ 1-2/3/4) aux antennes LacNAc ou en ( $\alpha$ 1-6) au résidu de GlcNAc proximal des N glycannes de type complexe et de type hybride fucosylés.

La digestion des N-glycannes de type oligomannosidique est la plus simple puisqu'elle n'implique qu'une seule exoglycosidase, la LAMAN. Cette dernière est une  $\alpha$ -mannosidase de classe II de la famille GH, capable de cliver toutes les liaisons  $\alpha$ -mannosidique connues<sup>[95]</sup>. La LAMAN exerce son activité sur des structures de type Man5-9GlcNAc1-2 pour former la structure Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc (ou Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc chez l'homme et le rongeur. La LAMAN a également en charge le catabolisme final des produits du catabolisme cytosolique des oligomannosides libres, orchestré par l' $\alpha$ -mannosidase cytosolique.

Le catabolisme des N-glycannes de type hybride et de type complexe quant à eux, font intervenir un plus grand nombre d'exoglycosidases (Figure : 9). Le catabolisme de ces structures débute par l'élimination de sulfate, de phosphate et d'acétyle respectivement par l'action d'une O-sulfatase, d'une O-phosphatase et d'une O-acétylase. Les acides sialiques, les résidus de  $\beta$ -Gal et de  $\beta$ -GlcNAc des antennes sont ensuite séquentiellement éliminés par les  $\alpha$ -sialidases, la  $\beta$ -galactosidase et l'une des N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidases. L'action séquentielle des enzymes présentés ci-dessus conduit à la formation du noyau pentasaccharidique Man3GlcNAc2.

●, Man ; ■, GlcNAc ; ●, Gal ; ◆, NeuAc ; ▲, Fuc.



**Figure 9** : Schéma illustrant le catabolisme lysosomal bidirectionnel des N-glycosylprotéines chez l'homme.

### 3.2 Dégradation des O-glycosylprotéines

Par rapport au catabolisme des protéoglycannes. Il existe peu de données concernant le catabolisme des O-glycosylprotéines contrairement aux N-glycosylprotéines. Il semblerait qu'une protéolyse complète préalable n'est pas nécessaire et qu'une libération des chaînes O-glycanniques des O-glycosylprotéines est envisagée. En effet, au cours de la dégradation lysosomale des protéoglycannes, la libération des chaînes de GAG est assurée par une endo-β-xylosidase avant qu'ils soient dégradés par des exoglycosidases et sulfatases spécifiques<sup>[96]</sup>. De plus, la N-acétyl-α-galactosaminidase est une exoglycosidase multifonctionnelle capable d'éliminer les résidus d'α-

GalNAc au niveau des extrémités terminales non réductrices peut également cliver la liaison O- $\alpha$ -glycosidique des O-glycosylprotéines de type mucine.

L'analyse du matériel glucidique accumulé dans les urines de patients atteints de déficit en N-acétyl- $\alpha$ -galactosaminidase ou une des  $\alpha$ -sialidases ou encore en cathepsin A, a révélé la présence de peptides O-glycosylés sialylés. Cela suggère que la N-acétyl- $\alpha$ -galactosaminidase interagirait transitoirement avec un complexe multienzymatique ternaire pour exercer son activité de peptidyl-O-glycosidase à la suite de quoi, les O-glycannes libérés seraient dégradés par les activités  $\alpha$ -sialidasique et  $\beta$ -galactosidasique du complexe transitoire. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de travaux montrant que le complexe multienzymatique ternaire forme un complexe transitoire avec la GalNAc-6-O-Sulfatase, un enzyme clé du catabolisme lysosomal des chaînes de GAG<sup>[97]</sup>.

## **4. Les enzymes de la glycosylation**

Plus de 250 enzymes<sup>[98]</sup> sont impliquées dans la biosynthèse des structures oligosaccharidiques sont retrouvées dans les glycoconjugués et plus de 30 enzymes différentes peuvent participer directement à la synthèse d'un seul N-glycane. Ces enzymes incluent les glycosidases et les glycosyltransférases.

### **4.1 Les glycosidases**

Il existe deux grands groupes de glycosidases.

- Le premier groupe est représenté par les endoglycosidases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques internes comme les endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidases clivent la partie N, N'-diacétyl chitobiose des N-glycannes.

- Le second groupe est représenté par les exoglycosidases qui catalysent la destruction de la liaison osidique de la partie non-réductrice de polymères de saccharides. Les fucosidases et les sialidases présentes dans les lysosomes font partie de ce groupe.

### **4.2 Les glycosyltransférases**

Les glycosyltransférases sont par définition des enzymes capables de catalyser l'addition d'un monosaccharide à un autre monosaccharide, à un polysaccharide, à un lipide, ou à un peptide. Les substrats donneurs sont utilisés sous une forme activée : les glycosylnucléotides (GDP-fucose, UDP-galactose, CMP-NeuAc, etc) et plus rarement, dans le cas de certaines mannosyltransférases et glucosyltransférases, sous forme lipide-saccharide, le dolichyl-phosphate-glucose<sup>[99]</sup>.

On estime qu'il existe plus de 100 liaisons glycosidiques différentes dans le répertoire des glycoconjugués des Vertébrés. Du fait que chaque liaison est catalysée par une glycosyltransférase

différente, il semblerait qu'il existe plus d'une centaine de loci de glycosyltransférases dans le génome des vertébrés.

Les glycosyltransférases sont nommées selon le saccharide qu'elles transfèrent. Par exemple « fucosyltransférase (FUT) » s'il s'agit d'un transfert du fucose (Fuc) ou « sialyltransférase (ST) » s'il s'agit d'acide sialique (NeuAc). Elles sont nommées aussi en fonction de la liaison formée entre le saccharide transféré et le substrat accepteur, ce dernier restant dans la majorité des cas de nature mono ou polysaccharidique. S'ajoutant à cette série non exhaustive des enzymes plus singulières comme l'oligosaccharidyltransférase, qui est un complexe protéique utilisant comme substrat donneur un oligosaccharide lié provisoirement à une molécule de dolichyl-phosphate (Dol-P), qui est ultérieurement transféré sur une protéine au cours des premières étapes de la biosynthèse des N-glycannes. Néanmoins, ce type de classification a de grandes limites car il demande une caractérisation complète du donneur, de l'accepteur et du produit avant que ne lui soit assigné un numéro par la commission des enzymes. Le besoin de surpasser ces limites a donné naissance à un nouveau système de classification proposé par Campbell et al.<sup>[100]</sup>. Ce système prenant en compte l'identité au niveau de la séquence protéique. Plusieurs travaux ont repris cette classification pour aboutir à 73 familles différentes<sup>[101]</sup>. La version actualisée de cette classification est disponible on-line (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) dans la banque informatique « Sugar-Active Enzymes Database » ou CAZy<sup>[102]</sup>. (Annexe : 4 ; Tableau :27)

Les glycosyltransférases des eucaryotes sont des glycoprotéines transmembranaires de type II associées aux compartiments cellulaires en particulier le RE et l'appareil de Golgi<sup>[99][103]</sup>. Cependant, des activités glycosyltransférases ont été identifiées dans le cytosol ainsi qu'à la surface de la cellule. Ils existe par ailleurs des formes solubles des glycosyltransférases qui sont présentes dans le sérum, le lait, la salive, l'humeur vitrée et plus généralement dans les fluides corporels<sup>[104]</sup>. Le pH optimal de fonctionnement des glycosyltransférases est compris entre 5 et 7. La présence d'ions  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou d'autres cations divalents sont nécessaires pour le fonctionnement optimal d'un certain nombre de glycosyltransférases<sup>[105]</sup>.

L'assemblage des oligosaccharides liés à des protéines ou à des lipides est réalisé d'une manière séquentielle et très ordonnée suite à l'action de multiples glycosyltransférases et glycosidases localisées dans les compartiments empruntés au cours des processus de synthèse et de maturation. Cette caractéristique mène à la formation de liaisons glycosidiques précises. Aussi, il est admis que l'organisation spatiale des différentes enzymes dans le RE et l'appareil de Golgi conditionne la structure finale du glycanne<sup>[106]</sup>.

## 4.3 La fucosylation

### 4.3.1 Le Fucose et son rôle biologique

L'addition des résidus Fuc sur une chaîne oligosaccharidique est souvent une modification terminale. Néanmoins, certaines fucosyltransférases sont capables d'ajouter un L-fucose directement sur les résidus sérine/thréonine des protéines. Le L-fucose (6-désoxy-L-galactose) est un monosaccharide commun à plusieurs N- et O-glycannes et aux glycolipides produits par les cellules de mammifères.

Des rôles importants des glycannes fucosylés ont été démontrés dans la formation des groupes sanguins<sup>[107]</sup> ainsi que l'observation de la modification de la fucosylation des glycannes au cours de maladies chroniques<sup>[108]</sup> et dans le cancer<sup>[109]</sup>.

Les glycannes fucosylés sont synthétisés par les fucosyltransférases en utilisant le GDP-fucose comme substrat donneur. Le GDP-fucose est synthétisé soit à partir de GDP-mannose dans une réaction à trois étapes (synthèse de novo) (Figure : 10), soit à partir du L-fucose libre (synthèse de récupération) correspondant à une voie alterne<sup>[110]</sup>. (Figure : 11).

Dans la voie de récupération, l'enzyme L-fucokinase synthétise du L-fucose-1-phosphate activé à partir du L-fucose provenant du cytosol par un apport de fucose extérieur ou comme produit de dégradation lysosomale et utilisent de l'ATP.

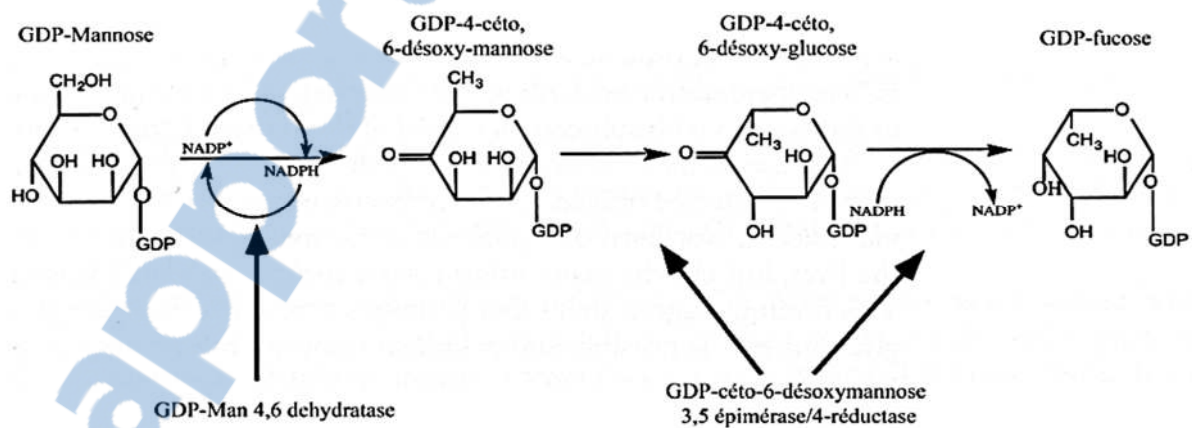


Figure 10 : La synthèse *de novo* du GDP-fucose. (Menon, S., M. Stahl, et al.1990)



**Figure 11 :** La voie de sauvetage du GDP-Fuc. Synthèse à partir du L-fucose. (Menon, S., M. Stahl, et al.1990)

### 4.3.2 Les fucosyltransférases

Les  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférases catalysent le transfert d'un résidu Fuc en liaison  $\alpha$ 1,2 sur un résidu Gal terminal des N- et O-glycannes<sup>[111]</sup>. Dans les tissus humains deux enzymes ayant cette caractéristique ont été retrouvées suivant le modèle proposé par Oriol<sup>[112]</sup>.

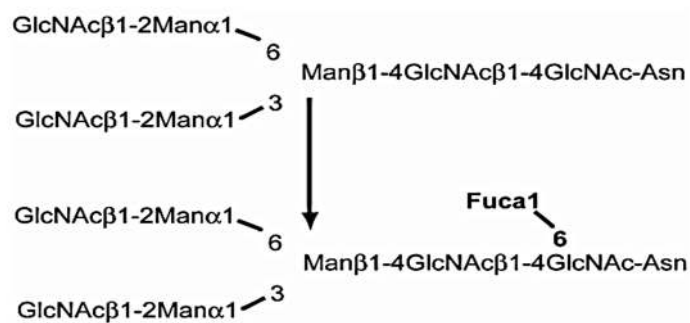
- L'enzyme de type H (FUT1)<sup>[113]</sup> qui se trouve dans les cellules hématopoïétiques et dans le plasma.

- L'enzyme de type sécréteur (FUT2)<sup>[114]</sup> possède la même activité catalytique que la fucosyltransférase H et régule la synthèse de l'antigène H au niveau des épithéliums d'origine endodermique produisant des sécrétions exocrines comme l'estomac, l'intestin et les glandes sous-maxillaires.

Un niveau supplémentaire de complexité dans l'élaboration des antigènes glucidiques des groupes sanguins résulte de l'existence de deux autres types de liaisons distales du fucose ( $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4), contrôlées par les  $\alpha$ 1,3/4-fucosyltransférases. Les différentes structures élaborées constituent le groupe d'antigènes tissulaires « Lewis ». Ces motifs sont portés essentiellement par des chaînes glycaniques de types 1 et 2 et greffés sur des lipides ou des protéines. Ils sont le plus souvent retrouvés à la surface de différents types cellulaires, mais ils existent également sous forme libres dans les sécrétions comme le lait<sup>[115]</sup>.

La  $\alpha$ (1,6)-fucosyltransférase FUT8 est le seul membre de la famille de fucosyltransférases qui branche un résidu de fucose sur le GlcNAc interne lié à l'Asn des glycoprotéines<sup>[116][117]</sup>. Cette enzyme est fortement exprimée dans certaines pathologies oncologiques, telles que le cancer ovarien, les hépatomes, hépato-carcinomes ainsi que dans les maladies chroniques du foie<sup>[118]</sup>. (Figure : 12)





**Figure 12 :** Activité de l' $\alpha(1,6)$ fucosyltransférase FUT8. (Transfert d'un résidu fucose sur le GlcNAc interne lié à l'Asn. Wilson, J. R., D. Williams, et al ; 1976)

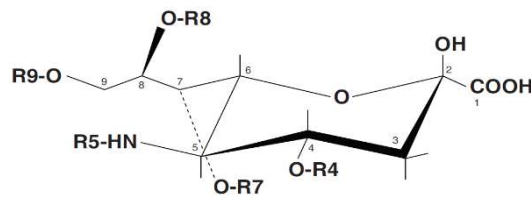
La O-fucosylation a été décrite dans de nombreuses espèces animales telles que l'homme ou la drosophile. La O-fucosylation décrite pour la première fois il y a plus de 30 ans, isolés comme des fucosides liés à des aminoacides dans l'urine humaine<sup>[119]</sup>. La première protéine identifiée portant des O-fucoses identifiée est l'activateur du plasminogène de type urinaire.

Plus tard, plusieurs protéines O-fucosylées participant à la coagulation ont été identifiées. Le gène FUT12 ou POFUT1 code pour une O-fucosyltransférase qui fixe un résidu fucose directement sur des chaînes polypeptidiques<sup>[120]</sup>.

## 4.4 La sialylation

### 4.4.1 Les acides sialiques et leurs rôles biologiques

L'acide sialique a été découvert il y a plus de soixante ans en tant que produit libéré par hydrolyse acide des glycolipides cérébraux ou des mucines salivaires<sup>[121]</sup>. Les acides sialiques sont des monosaccharides à neuf atomes de carbone qui constituent une vaste famille de plus de 40 membres<sup>[122]</sup>. Ce sont des dérivés de l'acide neuraminique (5-Amino-3,5-didésoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ulopyranosidique) comprenant des groupements N-acétylés ou N-glycolylés combinés à des résidus O-acétyl, ou moins fréquemment à des groupes O-lactyles, O-méthyles ou O-sulfate. Cette diversité structurale est unique et ne se retrouve sur aucun autre monosaccharide. Parmi tous les acides sialiques, seuls quelques-uns sont présents dans toutes les espèces animales. Ainsi chez l'homme, l'acide sialique majeur est la forme acétyl, l'acide 5-N-acétyl-neuraminique (5-acétamido-3,5-didésoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranoïque) (Figure :13).



**Figure 13 :** Squelette de l'acide sialique et les différentes substitutions possibles. (NeuAc) R5 = H, groupement acétyle, OH ou groupement glycolyl = Neu, Neu5Ac, KDN ou Neu5Gc, respectivement. R4, R7, R8 et R9 peuvent être des groupements acétyles, méthyles, sulfates ou phosphates.

Du fait de leur diversité structurale, les acides sialiques sont impliqués dans une vaste panoplie de processus biologiques. Leur fonction carboxylique leur confère une charge fortement électro-négative à pH physiologique. Cette charge négative combinée à leur position à l'extrémité des chaînes oligosaccharidiques leur confère un rôle central dans la régulation de nombreux mécanismes de reconnaissance moléculaire. Ils peuvent moduler les interactions, soit uniquement par leurs propriétés physico-chimiques, soit en tant que constituants de motifs glycaniques susceptibles d'être reconnus par des lectines endogènes. Les forces répulsives entre ces charges négatives stabilisent la structure des glycoprotéines et sont importantes dans les fonctions de lubrification et de protection des mucines dans la salive et les cellules épithéliales<sup>[122]</sup>.

De par leur charge, leur caractère hydrophile et leur taille, les acides sialiques peuvent influencer les interactions protéine-protéine en limitant leurs accès à des motifs peptidiques localisés en cis des chaînes glycaniques.

En ce qui concerne leurs effets physico-chimiques, les acides sialiques contribuent au caractère électro-négatif des surfaces cellulaires. Ils sont donc à l'origine des forces de répulsion électro-négatives entre les cellules. En conséquence, la perte d'acide sialique observée à la surface des cellules apoptotiques peut théoriquement favoriser les contacts avec les cellules susceptibles de les phagocyter. Ces mêmes charges négatives inhibent l'agrégation des érythrocytes<sup>[123]</sup>.

Ils jouent également un rôle de masque pour les structures galactosylées sur lesquelles ils sont liés et c'est probablement leur fonction la plus connue<sup>[124,125,126]</sup>.

Les acides sialiques jouent également un rôle dans le processus de reconnaissance. Ce sont des composants nécessaires des récepteurs de plusieurs substances endogènes comme les cytokines et certaines hormones. Ainsi beaucoup d'agents pathogènes, tels que les bactéries comme *Escherichia coli*<sup>[127]</sup> ou *Helicobacter pylori*<sup>[128]</sup>, virus (ex. Influenza)<sup>[129]</sup>, toxines (ex. toxine du choléra<sup>[130]</sup>), et

Protozoaires (ex. *Trypanosoma cruzi*)<sup>[131]</sup> se lient aux cellules de l'hôte via des récepteurs contenant de l'acide sialique.

#### 4.4.3 Les sialyltransférases

La biosynthèse des oligosaccharides sialylés est catalysée par une famille d'enzymes dénommées sialyltransférases (ST). Se sont des glycosyltransférases ayant une topologie transmembranaire de type II, qui utilise le CMP-acide sialique comme substrat donneur. Les sialyltransférases humaines sont une famille composée d'au moins 20 glycosyltransférases golgiennes<sup>[132]</sup>.

Chez les mammifères, les acides sialiques se trouvent dans la partie terminale non-réductrice des glycoconjugués en liaison  $\alpha$ 2,3- ou  $\alpha$ 2,6 sur un résidu  $\beta$ -D-galactopyranosyl (Gal), ou en  $\alpha$ 2,6 sur un résidu  $\beta$ -D-N-acétylgalactosaminyl (GalNAc). Le transfert de ces résidus est catalysé par les membres ST3 et ST6 de la famille des sialyltransférases. L'activité de ces enzymes est modifiée par plusieurs facteurs comme l'expression oncogénique, les systèmes de second messager, les hormones stéroïdiennes et les métaux lourds. (Annexe : 4 ; Tableau : 27)

L'acide sialique se trouve aussi en liaison  $\alpha$ 2,8 dans les gangliosides et dans l'acide polysialique. Ce type de structure étant catalysé par les  $\alpha$ 2,8 sialyltransférases.

Les  $\alpha$ 2,6-sialyltransférases ST6 Gal-I<sup>[133]</sup> et la ST6 Gal-II<sup>[134]</sup> sont chargées du transfert d'un résidu d'acide sialique en  $\alpha$ 2,6 sur le résidu du galactose terminal de la lactosamine de type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc). La ST6 Gal-I montre une préférence pour la forme liée à une protéine et la ST6 Gal-II pour le disaccharide libre.

Chez l'homme les ST6 GalNAc-I, -II et -IV catalysent la formation des liaisons  $\alpha$ 2,6 sur des résidus GalNAc liés par O-glycosylation sur des résidus Ser/Thr (Annexe :4)

La ST6 GalNAc-I agit sur les GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr, Gal $\beta$ (1,3)GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr et le Neu5Ac $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1,3)GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr<sup>[135]</sup>. La transfection de la ST6 GalNAc-I sur les lignées cancéreuses provoque l'expression de l'antigène sialyl-Tn (STn), qui est surexprimé dans plusieurs cancers et associé à un mauvais pronostic<sup>[136]</sup>.

De son côté, la ST6 GalNAc-II réagit sur le Gal $\beta$ (1,3)GalNAc-Ser/Thr et le Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ (1,3)GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr<sup>[137]</sup>.

Les ST6 GalNAc-III, -V et -VI catalysent l'addition des résidus d'acide sialique sur le résidu GalNAc des gangliosides. La ST6 GalNAc-V est exprimée seulement dans le cerveau et paraît être spécifique du GM1b <sup>[138]</sup>.

#### 4.4.4 Les sialidases

La sialidase (SA) (neuraminidase, N-acétylneuraminosyl-glycohydrolase) est l'enzyme clé du catabolisme de l'acide sialique. Elle hydrolyse les liaisons entre l'acide sialique et l'avant dernier saccharide des chaînes glycosylées.

La SA augmente certainement l'impact de certaines espèces microbiennes en leur donnant la capacité de cliver l'acide sialique terminal des cellules hôtes. Cette capacité permet leur propagation et l'invasion des tissus comme cela a été démontré chez *Clostridium perfringens* et *Bacteroides fragilis*<sup>[143]</sup>. En démasquant les structures sub-terminales des récepteurs pour les parasites et les toxines elles deviennent disponibles, comme il a été montré pour la toxine du choléra <sup>[144]</sup>. La SA, retrouvée à la surface des virus Influenza A et B clive également les acides sialiques de la couche de mucus protectrice de l'appareil respiratoire, ce qui permet la dispersion du virus<sup>[145]</sup>.

### 5. Glycoconjugués et cancers

Les oligosaccharides non exprimés par la cellule normale et exprimés par la cellule tumorale lui confèrent de nouvelles propriétés, par exemple la capacité à s'affranchir des liaisons avec les cellules environnantes, à traverser les parois vasculaires ou à s'amarrer à des tissus pour former des métastases. Lorsque ces oligosaccharides sont présents sur des cellules normales mais qui ont un potentiel invasif physiologique, tels que les polynucléaires dans la réponse inflammatoire, les cellules tumorales qui les portent sont alors susceptibles d'utiliser les mécanismes de dissémination réservés à ces cellules normales après les avoir détournés.

La glycosylation peut être modifiée au cours du développement embryonnaire et de l'activation cellulaire donc au cours des processus de transformation cellulaire. Ces changements de glycosylation donnent lieu à l'apparition anormale de nouvelles structures glycaniques regroupées sous le terme d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs. Tout comme les cellules normales au cours de l'embryogénèse, les cellules cancéreuses subissent des phases d'activation et de croissance cellulaire intense, adhèrent à d'autres types cellulaires et à d'autres matrices extracellulaires et envahissent par conséquent les tissus. Les principales modifications de la glycosylation généralement observées dans les cancers sont :

- Une augmentation des branchements en ( $\beta$ 1-6) par des résidus de GlcNAc sur la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique des N-glycannes (surexpression de la GlcNAc-TV).
- Un raccourcissement des O-glycannes de type mucine (T, Tn, sialyl-Tn).
- Des modifications de la sialylation des N- et O-glycannes et de l'acétylation des acides sialiques, la réexpression d'acide N-glycolyl-neuraminique (NeuGc).

- L'expression d'antigènes à activités de groupe sanguin de type ABH et de type Lewis.
- L'expression des ligands glucidiques des sélectines, par l'augmentation de l'expression des galectines et des séquences polylactosaminiques à la surface des cellules.
- Une modification de la sulfatation des N- et O-glycannes (mucine et GAG).

Il a été démontrée que certaines de ces modifications, tels que l'augmentation du taux d'antennarisation en ( $\beta$ 1-6) des N-glycannes et l'expression des ligands glucidiques des sélectines participent activement à la physiopathologie des cancers, notamment au caractère invasif de certains d'entre-eux qui forment des métastases [146][147][148].

De nombreux types de séquences glycaniques ont été étudiés soit dans le but de montrer la disparition de résidus normalement présents, soit le plus souvent, de mettre en évidence l'apparition de structures nouvelles. Ces séquences glycaniques sont des monosaccharides situés à l'extrémité des chaînes ou bien des motifs plus volumineux correspondant à des oligosaccharides ou à des déterminants antigéniques clairement identifiés (antigènes T et Tn, tétrasaccharide caractéristique des antigènes A, B, H, Lewis b, Lewis a sialylé, Lewis x, Lewis y et la séquence (GlcNAc $\beta$ (1,6)Man $\alpha$ (1,6)Man $\beta$ -Asn,). Par ailleurs, des anomalies relatives à la configuration de chaînes polyantennées, comprenant notamment des résidus de type N-acétyl-lactosamine ont été recherchées. Elles semblent correspondre à une variabilité dans les propriétés métastatiques des cellules (Tableau :4).

**Tableau 4** : Principaux glycanes associés aux tumeurs. Bull Cancer 2004

Antigène ou séquence glycanique	Structure
<b>Glycoprotéines</b>	
Tn	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Sialosyl-Tn	SA $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
T	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Sialosyl-Le <sup>a</sup>	SA $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal-   $\alpha$ 1-4 Fuc
Le <sup>x</sup>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal-   $\alpha$ 1-3 Fuc
Sialosyl-Le <sup>x</sup>	SA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal-   $\alpha$ 1-3 Fuc
Le <sup>y</sup>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal   $\alpha$ 1-2        $\alpha$ 1-3 Fuc          Fuc
N-acétyllactosamine	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
Séquence $\beta$ 1-6-branchée	GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ - (oligosaccharides N-liés)

Parmi ces glycoconjugués, de nombreuses molécules qui apparaissent clairement impliquées dans le processus de cancérisation ont été étudiées dans un but diagnostique, pronostique, thérapeutique ou dans la compréhension des facteurs héréditaires, qu'elles soient N-glycosylées comme BRCA1 ou BRCA2<sup>[149]</sup>, ou O-glycosylées comme Muc1 (CA15-3) qui ont un intérêt pronostique majeur dans le cancer du sein<sup>[150]</sup>.

Enfin, selon l'hypothèse que les glycoconjugués jouent un rôle majeur dans les phénomènes de reconnaissance entre les cellules et que cette fonction se fait par l'intermédiaire d'une liaison impliquant un mécanisme lectinique exprimés lors d'une étape même très brève de l'embryogenèse<sup>[151]</sup> ce qui a conduit Kanska et al. à montré l'existence de modification de résidus GalNAc-O-Ser/Thr et N-acétyl-lactosamine dans certains cas de fibroadénome ou de dystrophie fibrokystique qui peuvent précéder les anomalies caractéristiques de la transformation maligne. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont mis en évidence, dans certains cas des carcinomes canauxaires invasifs une modification dans la nature et la densité des glycoconjugués en relation avec le stade d'évolution de la maladie<sup>[152]</sup>.

Les motifs glycaniques qui apparaissent sur les cellules tumorales semblent provenir soit d'un raccourcissement des chaînes oligosaccharidiques normales, en relation avec un dysfonctionnement d'une ou de plusieurs glycosyltransférases, soit au contraire de nouvelles synthèses aboutissant à une extension des chaînes glycaniques<sup>[153]</sup>. Parmi les principales structures caractérisées, certaines correspondent à des glycannes O-liés, d'autres à des glycannes N-liés<sup>[154]</sup>. Il est important de noter que des oncogènes et des facteurs de transcription impliqués dans la cancérogenèse contrôlent la transcription de glycosyltransférases.

Les mécanismes qui régulent le niveau de sialylation des glycoconjugués à la surface cellulaire sont en général très importants. Il existe des modifications importantes des types d'acides sialiques et de leur niveau de synthèse dans les maladies cancéreuses. Dans certains cas, il a été montré que l'acide sialique est associé au potentiel métastatique du cancer par l'augmentation de l'acide sialique et particulièrement de l'acide sialique lié en  $\alpha 2,6$ . Par contre dans le cancer colorectal, il y a une diminution significative de l'acétylation des résidus d'acide sialique en position C9. Dans la plupart des cas, la modification est associée à la malignité et correspond au profil de glycosylation embryonnaire du tissu en question. L'augmentation de la sialylation peut être la conséquence de l'altération des mécanismes cellulaires normaux.

Dans plusieurs cancers comme le cancer colorectal, le cancer thyroïdien et la leucémie, l'augmentation de la sialylation est un indicateur de mauvais pronostic qui peut être expliqué par une augmentation du nombre et du degré de branchement des N-glycannes et des chaînes de

polylactosamines. Une augmentation des résidus d'acide sialique sur les glycoprotéines membranaires et les gangliosides est associée à un potentiel réduit des compétences métastatiques d'invasion et d'adhésion cellulaire dans certaines cellules cancéreuses. Le Neu5Gc a été proposé comme un épitope oncofœtal du fait qu'il est rarement trouvé chez l'adulte alors qu'il est synthétisé dans les tissus fœtaux. En effet, il est responsable d'une forte réponse immunologique (contre le Neu5Gc) chez le patient atteint de cancer<sup>[146]</sup>.

## **6. Les oligosaccharides des glycoprotéines et la migration cellulaire**

Il semble que l'invasion des tissus par les cellules tumorales est possible quand ces dernières possèdent des oligosaccharides avec des branchements incluant des liaisons GlcNAc $\beta$ (1,6)Man et leur extension en chaîne du type NeuAc-(Gal-GlcNAc)<sub>n</sub>. D'après cette théorie, des substances comme la swainsonine ou la castanospermine sont capables d'inhiber la formation de ces oligosaccharides pourraient être utilisées comme des drogues anti-tumorales. Il a été démontré que certaines cellules cancéreuses qui migrent et conduisent à des métastases possèdent des résidus Gal $\alpha$ (1,3)Gal qui sont reconnus spécifiquement par une immunoglobuline appelée Anti-Gal ; un anticorps naturel représentant jusqu'à 1% des immunoglobulines G (IgG) circulantes dans le sérum humain. Cet anticorps réduit considérablement la faculté des cellules cancéreuses malignes à se fixer sur de nouveau tissus, et de cette façon ralentit la métastase. L'anticorps Anti-Gal est donc une défense naturelle présente dans le sérum contre la métastase<sup>[155][156]</sup>.

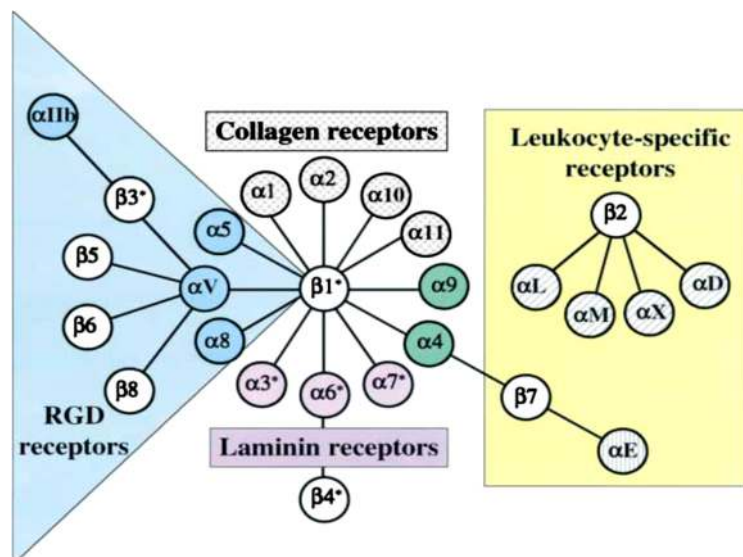
Une cellule tumorale envahit le tissu environnant en entrant dans le système circulatoire. Elle adhère puis pénètre dans l'endothélium vasculaire d'un organe cible, envahit le tissu de l'hôte et démarre sa prolifération. Dans chacune de ces étapes il y a des interactions entre la cellule cancéreuse et son environnement. Ces interactions impliquent très souvent des glycoprotéines. Des études suggèrent que la métastase est liée à l'apparition d'oligosaccharides de surface différents<sup>[139]</sup> aussi bien pour les cellules malignes que pour les cellules normales. C'est bien le cas des intégrines qui sont des glycoprotéines appartenant à une famille des récepteurs transmembranaires qui interviennent dans les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire ou entre cellule à cellule<sup>[157]</sup>.

Les intégrines se composent de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . On connaît actuellement 24 hétérodimères distincts d'intégrine. Ils se composent de 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ . L'espace extracellulaire est connu pour avoir un rôle pivot dans le comportement cellulaire. Comme récepteurs, les intégrines déterminent l'ancrage et le mouvement des cellules par l'intermédiaire de l'identification des molécules variables de la matrice extracellulaire<sup>[158]</sup>. Par ailleurs, les signaux intracellulaires

produits par les intégrines influencent souvent l'expression du gène qui affecte la régulation de l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire. En dehors de leur rôle dans des événements physiologiques, les intégrines sont également concernées dans de nombreuses situations pathologiques telles que l'inflammation et la progression tumorale.

## 6.1 Les Intégrines comme récepteurs de matrice extracellulaire

Il existe 12 hétérodimères d'intégrine contenant les sous-unités  $\beta 1$  et qui sont des récepteurs pour différentes molécules de la matrice extracellulaire (ECM) telles que les collagènes, les laminines, la fibronectine et le tenascin. Les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  sont connues pour être principalement des récepteurs de collagène. L'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  semble se fixer principalement sur le collagène de type IV, mais aussi sur les collagène de types I-VI et le type XIII<sup>[159]</sup>, alors que l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est un récepteur pour le collagènes de types I-VIII<sup>[160]</sup>. En outre,  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  elles peuvent se fixer sur laminins 1, 2 et 4, alors que  $\alpha 2\beta 1$  seul se fixe sur la tenascin comme l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Elle interagi avec chacun des types de collagène sans être principalement un récepteur pour le collagène alors que les laminins 1 et 5 semblent être les ligands principaux pour  $\alpha 3\beta 1$ <sup>[161]</sup>. De même, les laminines sont les ligands pour les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 7\beta 1$ . La sous-unité  $\alpha 6$  peut également former un hétérodimère avec  $\beta 4$ . Cette combinaison ( $\alpha 6\beta 4$ ) sert de récepteur de laminine dans les hemidesmosomes, sites spéciaux d'adhérence liant les cellules épithéliales aux membranes basales. Récemment, deux sous-unités d'intégrine,  $\alpha 10$  et  $\alpha 11$  fixant le collagène ont été découvertes. Chacune d'elle forme avec l'intégrine  $\beta 1$  des hétérodimères. L'intégrine  $\alpha 10\beta 1$  était initialement purifiée avec le collagène de type II<sup>[162]</sup>, et l'intégrine  $\alpha 11\beta 1$  a été decrite se fixant au collagene de type I<sup>[163]</sup> (Figure :14).n



**Figure 14 :** Famille des récepteurs des intégrines. (Hynes, 2002).

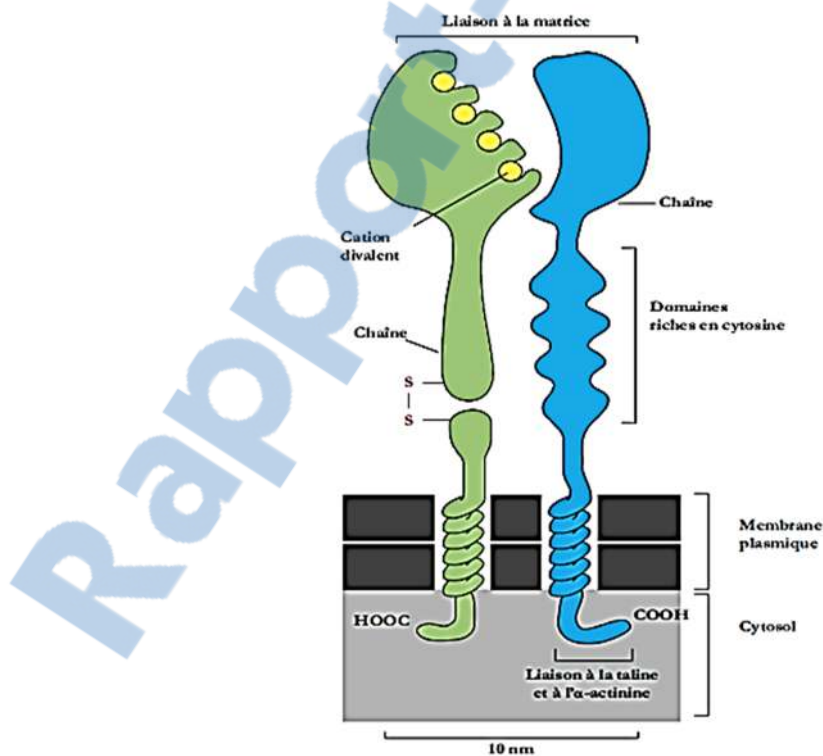


Trois intégrines  $\beta 1$  différentes sont connues pour assurer des interactions de cellule aux fibronectines. Bien que les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  soient les deux récepteurs de fibronectine.

Une autre grande sous-famille d'intégrines se compose d'hétérodimères partageant la sous-unité de  $\alpha V$ . Les intégrines  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ , et  $\alpha V\beta 8$  se fixent à la fibronectine par le motif RGD et la plupart d'entre elles fonctionnent comme des récepteurs de vitronectine. L'intégrine  $\alpha V\beta 5$  est un récepteur préférentiel de vitronectine alors que  $\alpha V\beta 6$  a une affinité plus élevée pour la fibronectine. En plus des intégrines de  $\alpha V$ , l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  peut se fixer au motif de RGD de la vitronectine et fibronectine, bien qu'elle assure principalement la fixation des plaquettes au fibrinogène.

## 6.2 Structure des intégrines

Chaque sous-unité d'intégrine possède un grand domaine extracellulaire qui porte des sites de glycosylation, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire C-terminal de longueur variable de 40-50 acides aminés. Le domaine intracellulaire le plus court se trouve dans la sous-unité  $\alpha 1$ , alors que la sous-unité  $\beta 4$  exprime un domaine intracytoplasmique particulièrement long composé de 1018 acides aminés (Figure : 15).



**Figure 15 :** Représentation schématique d'une intégrine avec ses deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . (Bull Cancer hors-série, avril 2006).

Les sous-unités  $\alpha$  de l'intégrine varient selon leurs tailles de 150 à 200 kDa. Toutes les sous-unités  $\alpha$  contiennent sept répétitions d'environ 60 acides aminés de la région N-terminale qui forment une structure extracellulaire connue sous le nom de b-propulseur. De même que pour la sous-unité  $\beta$ , cette structure porte des sites de glycosylations et forme le site récepteur du ligand. Dans la plupart des cas, le b-propulseur contient des séquences de fixation à des cations bivalents. Des sous-unités d'intégrine  $\alpha$  peuvent se composer de chaînes lourdes et légères qui sont liées par des ponts disulfures. Cette structure est située entre la deuxième et la troisième région qui fixe les cations sur la structure de b-propulseur<sup>[164]</sup> et participe au site de fixation du ligand. La cristallographie à rayon X a indiqué que le domaine I a un site de fixation pour le  $Mg^{2+}$ . La présence de  $Mg^{2+}$  s'avère nécessaire pour la fixation du ligand<sup>[165]</sup>.

Les sous-unités  $\beta$  de l'intégrine sont glycosylés et possèdent plusieurs régions d'homologies entre elles. La plupart ont une taille de 90-110 kDa, excepté  $\beta_4$ , qui est considérablement plus grande (210 kDa). Plusieurs régions répétées riches en cystéine sont présents dans la région C-terminale de chaque sous unité  $\beta$ <sup>[166]</sup>.

### **6.3 Intégrines dans le Cancer humain**

Les modifications structurales des intégrines pendant la transformation maligne sont dépendantes du type du cancer. Par ailleurs une structure modifiée des intégrines permet aux cellules cancéreuses d'identifier des composants variables de la matrice extracellulaire et de provoquer des variations de la signalisation dans l'expression des gènes modifiés. Plusieurs observations décrivant les variations relatives de l'expression des intégrines qui ont été réalisées in vitro et in vivo avaient établi le lien entre la régulation de l'expression des intégrines et le cancer<sup>[167]</sup>.

### **6.4 Intégrines et migration cellulaire.**

L'expression des intégrines varie selon le type de cancer, les différents types cellulaires de tumeurs et même entre les cellules tumorales à l'intérieur d'une même tumeur. Ainsi, les intégrines ont un rôle essentiel dans le processus d'envahissement en établissant des liaisons entre la cellule et la MEC.

Les données de l'expression des intégrines dans divers types de cancers humains permettent de tirer quelques conclusions. Certaines d'entre elles comme  $\alpha V\beta_3$ , semblent initier la progression tumorale et la métastase. Le fait que quelques cellules agressives n'expriment pas cette intégrine signifie qu'aucun des récepteurs d'adhérence n'est responsable à lui seul du processus<sup>[168]</sup>. Il est également important de souligner que certaines intégrines ont des fonctions distinctes selon le type

cellulaire. A titre d'exemple, l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  peut participer au maintien du phénotype différencié des cellules épithéliales de sein et sont donc réprimées dans le cancer du sein. Par contre, dans le mélanome, le cancer de la prostate et le cancer de l'estomac cette même intégrine est associée à la progression tumorale et à l'invasion. Plusieurs modèles expérimentaux supportent l'idée que l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est essentielle pour la migration de la cellule cancéreuse, l'envahissement locorégionale et la formation de métastase<sup>[169][170]</sup>.

Il est également important de rappeler que la répression d'une sous-unité d'intégrine dans les cellules cancéreuses ne signifie pas forcément que le récepteur est sans importance pour le phénotype malin ou qu'il a un rôle de gène suppresseur de tumeur. Le rôle des intégrines n'est pas limité à leur fonction mécanique dans des sites de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire mais elles sont également capables d'activer des signaux intracellulaires. L'instabilité génomique conduit probablement aux changements de l'expression des molécules de signalisation cellulaire et des voies qui affectent également les intégrines. Ainsi, l'expression d'une intégrine peut être modulée pendant la progression tumorale qui était réprimée durant la transformation, parce qu'elle portait un phénotype normal et empêchait donc la croissance des cellules. Elle peut également jouer un rôle essentiel dans le processus d'invasion du cancer<sup>[171]</sup>.

## 6.5 Participation de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la motilité de cellules

L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est une glycoprotéine qui comporte respectivement 12 sites potentiels de N-glycosylation sur les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Plusieurs travaux ont été réalisées sur la glycosylation N-liées de  $\alpha 3\beta 1$  humaine<sup>[172]</sup> dans des lignées différentes de cellule cancéreuse. Dans le cancer de colon l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est une sialoglycoprotéine qui contient une structure d'oligosaccharides de branchement  $\beta 1-6$  et une structure poly-N-acetylactosamine<sup>[173]</sup>. Plusieurs travaux grâce à la spectrométrie de masse MALDI ont comparé les profils de glycosylation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des différentes variétés de cellule humaines<sup>[174]</sup>. L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  isolée dans les cellules épithéliales urétérales humaines présente des types complexes d'oligosaccharides avec une hétérogénéité large des glycannes dans les deux sous-unités. Le test d'adhérence a indiqué que les cellules normales et malignes de l'uretère interagissent entre elles par l'intermédiaire du collagène IV, la laminine et la fibronectine et dont l'intensité dépend de la ligné cellulaire et du profil de glycosylation. Une diminution de l'adhérence à la laminine et à la fibronectine a été constatée après traitement à la neuraminidase dans toutes les variétés de cellules étudiées, en dépit du potentiel métastatique des cellules, les N-oligosaccharides sialylés influencent donc fortement les capacités d'adhérence des cellules<sup>[175]</sup>. De même dans le mélanome et le mélanome métastatique les N-oligosaccharides de branchement  $\beta(1,6)$  des intégrines  $\alpha 3\beta 1$  contribuent à l'adhérence des cellules à la fibronectine. Le

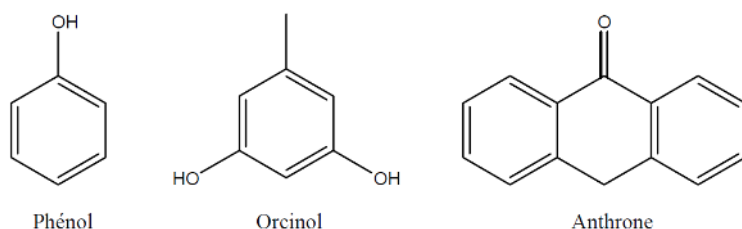
traitement des cultures cellulaires avec la swainsonine qui est un inhibiteur de la mannosidase II a réduit le taux de migration des cellules de 11% dans les cellules A375 et de 38% dans les cellules WM9<sup>[176]</sup>. Kremser et al.<sup>[177]</sup> a décrit l'hétérogénéité du mode de glycosylation de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  dans deux variétés de cellule de mélanome métastatique (WM9, WM239) d'origine différente. En effet ils ont montré que les N-glycoprotéines influencent fortement l'interaction de ce récepteur avec son ligand primaire dans les deux variétés cellulaires. Cet effet étant plus prononcé dans les cellules WM9, où l'intégrine  $\alpha3\beta1$  présentait une glycosylation plus variée. Ces résultats s'accordent avec ceux de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  dans l'adhérence de cellules urétérales<sup>[174]</sup>. Par ailleurs il est à noter que  $\alpha3\beta1$  est hautement associée au pouvoir métastatique et peut être modifiée par les enzymes GnT-III ou GnT-V<sup>[178]</sup>. La GnT-III inhibe la migration des cellules alors que la GnT-V stimule l'expression de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  et favorise ainsi la migration cellulaire en modifiant toute les deux de façon compétitive les mêmes sites de glycosylation. Cette compétitivité peut réguler l'activité de la protéine cible et par conséquent, comme pour l'intégrine  $\alpha5\beta1$  un changement conformationnel des régions importantes de la dimérisation.

## 7. Méthodes d'analyses des monosaccharides et glycoprotéines

### 7.1 Détermination de la composition centésimale en monosaccharides par méthodes colorimétriques

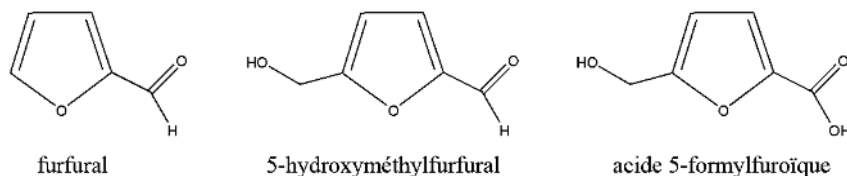
#### 7.1.1 Dosage des oses neutres et acides uroniques

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides. Elles s'appliquent aussi bien aux résidus qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques. Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation par estérification d'un chromogène (Figure : 16).



**Figure 16:** Structure des chromogènes utilisés.

En milieu acide fort et à chaud, les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques se déshydratent et donnent naissance à des dérivés du furfural, soit le 5-hydroxyméthylfurfural et l'acide 5-formylfuroïque (Figure : 17).



**Figure 17:** Dérivés furfuraliques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques.

Les chromophores ainsi formés, absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents. La quantité des sucres totaux, dosés selon la méthode de Dubois<sup>[179]</sup>, utilise le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que certains chromogènes, tels que le naphтол ou l'antrone. Pour le dosage des acides uroniques le méta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif<sup>[180]</sup>.

Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques ont été déterminées par une méthode qui élimine les interférences des acides uroniques dans le dosage des sucres totaux développée par Montreuil et Spick<sup>[181]</sup>.

### **7.1.1.1 Dosage des monosaccharides neutres**

Le principe de dosage colorimétrique des monosaccharides neutres varie suivant qu'il s'agit d'hexoses, de 6-désoxyhexoses ou de pentoses. Cependant, tous les procédés tirent parti de la formation de produits de dégradation des sucres sous l'action des acides forts. Ces chromogènes qui sont la plupart du temps des dérivés du furfural (Figure : 21) sont ensuite condensés avec diverses substances qui sont généralement des phénols pour former des chromophores<sup>[182]</sup>.

### **7.1.1.2 Dosage des acides uroniques**

La méthode au carbazol sulfurique de Dische est la plus couramment utilisée. Son principe est fondé sur le développement d'un chromophore violet par condensation de l'acide formylfuroïque formé à chaud par l'acide sulfurique et le carbazol ou dibenzopyrrole<sup>[180]</sup>.

### **7.1.2 Dosage des osamines**

Contrairement aux méthodes précédentes qui sont directement applicables aux oligo- et polysaccharides et aux glucides conjugués, les différentes méthodes de dosage colorimétrique des osamines et N-acétylosamines conjuguées nécessitent leur libération préalable par une hydrolyse acide. La coloration est ensuite développée sur l'osamine libre ou préalablement ré-N-acétylée sous forme de N-acétylosamine. La méthode de dosage d'Elson et Morgan des osamines libres est la plus couramment utilisée<sup>[182]</sup>.

### **7.1.3 Dosage des acides sialiques**

Le dosage colorimétrique des acides sialiques peut être effectué par deux procédés différents, la première méthode de Niazi et State<sup>[140]</sup> est applicable aux sialoconjugués natifs, tandis que la seconde (méthode de Warren) nécessite l'hydrolyse préalable des liaisons sialosyl soit par une réaction chimique soit par une réaction enzymatique.

#### **7.1.3.1 Dosage des acides sialiques conjugués**

La méthode de Niazi et State est fondée sur l'emploi du réactif de Dische à la diphénylamine destinée à l'origine à doser les acides désoxyribonucléiques. Le mécanisme de la réaction passe par la formation d'un chromophore qui forme le 2-désoxy- 4-amino-octose et qui en se condensant avec la diphénylamine développe une coloration bleu-violacée<sup>[183]</sup>.

### **7.1.3.2 Dosage des acides sialiques libres**

Le dosage des acides sialiques libres par la méthode de Warren s'effectue en deux étapes :

- Libération des acides sialiques soit par hydrolyse acide douce, en raison de la fragilité des liaisons cétosyl des acides sialiques et de ces composés eux-mêmes soit par hydrolyse enzymatique réalisée avec des neuraminidases.

- Formation d'un chromogène par oxydation périodique de l'acide formylpyruvique qui après condensation avec l'acide 2-thiobarbiturique donne un chromophore de coloration rose ( $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$ )<sup>[339]</sup>.

## **7.2 Purification des glycoprotéines**

Les procédés généraux de fractionnement et de purification des protéines sont parfaitement applicables aux glycoprotéines. Les mécanismes d'action des différents agents de fractionnement utilisés sont toutefois dominés par l'influence des glycannes très hydrophiles par leurs fonctions hydroxylées ou plus encore, par leurs groupements ionisables des résidus sialylés, phosphorylés et sulfurylés qui solvatent la protéine.

De nombreuses méthodes de purification sont connues, néanmoins, nous nous limitons à décrire certaines d'entre elles comme les méthodes de relargage qui sont fondées sur les propriétés de solubilisation des glycannes et des protéines, ainsi que les méthodes de chromatographie par immunoaffinité appliquées aux protéines et au glycannes.

### **7.2.1 Méthodes de relargage**

Les méthodes le plus couramment utilisées sont fondées sur des précipitations fractionnées en appliquant aux solutions de glycoprotéines :

- Soit des gradients de concentration en éthanol à des températures inférieures à 0 °C afin d'éviter la dénaturation des protéines par l'alcool qui sont appliquées au fractionnement des protéines du plasma sanguin.

- Soit des gradients de concentration en sels neutres. Le sulfate d'ammonium étant le plus couramment utilisé associés à des gradients de pH. On fractionne, par exemple, le plasma sanguin utilisant 3 concentrations : 33, 50 et 100% de saturation pour chaque étape à 3 pH différents : 7, 5 et 3. On obtient ainsi 9 précipités qui sont soumis après dialyse à des sous-fractionnements par différentes méthodes chromatographiques (tamisage moléculaire, échange d'ions, affinité par lectines ou anticorps immobilisés) ou par l'électrophorèse préparative. Dans le cas particulier des glycoprotéines possédant plus de 20 p. 100 de glucides, on tire partie de la protection que jouent les glycannes vis-à-vis de la dénaturation de la protéine et de leur pouvoir salvateur pour leurs appliquer des procédés drastiques de fractionnement<sup>[184]</sup>.

### **7.2.2 Méthodes chromatographique par immunoaffinité**

Ces procédés utilisent des anticorps immobilisés sur des supports chromatographiques divers. On peut ainsi obtenir en deux temps des glycoprotéines pures puisque les anticorps ont une spécificité très étroite vis-à-vis des déterminants antigéniques peptidiques. Après fixation de la glycoprotéine sur son support par simple passage de la solution complexe de glycoprotéines et lavage soigneux de la colonne, la glycoprotéine recherchée est éluée par des solutions salines à des concentrations et pH appropriés.

Bien évidemment, l'application de la chromatographie par immunoaffinité nécessite des anticorps fournis soit par des techniques de cultures cellulaires, soit par injection à des animaux des glycoprotéines pures, préalablement isolée et purifiée. L'intérêt de la chromatographie par immunoaffinité est d'isoler rapidement une grande quantité d'une même glycoprotéine<sup>[185]</sup>. Dans certains cas, des techniques analytiques ne sont applicables qu'à des glycopeptides puisque certaines lectines interagissent d'une manière non-spécifique avec la chaîne peptidique mais d'une manière spécifique avec les glycanes des glycopeptides. Par conséquent l'étude des glycanes des glycoprotéines membranaires sont réalisés après attaque protéolytique ménagée des membranes et la production de glycopeptides et glyco-aminoacides à partir de glycoprotéines qui ont été isolées par l'action de différentes protéases, la plus efficace étant la Pronase de *Streptomyces griseus*.

### **7.3 Préparation de glycopeptides membranaires**

Les glycoprotéines membranaires extraites des membranes cellulaires sont insolubles dans l'eau et ne se prêtent pas à l'application des méthodes de fractionnement des protéines. Leur préparation exige en outre, l'isolement préalable des membranes cellulaires. L'étude de la structure des glycanes des glycoprotéines est réalisée sur les glycopeptides obtenus par attaque protéolytique ménagée<sup>[186]</sup>.

La technique la plus communément utilisée est l'hydrolyse acide qui permet l'obtention de monosaccharides sous leur forme réductrice. Ces techniques reposent sur l'utilisation des acides organiques volatils qui sont facilement éliminés après hydrolyse.

Ces techniques utilisent le TFA 2 N, 1 h à 121°C<sup>[187]</sup> ou 3 N, 4 h à 105°C<sup>[188]</sup>, ou encore un mélange acide formique à 88% et acide trifluoroacétique et l'eau (10/1/2 v/v/v) pendant 16 h à 100°C ou (3/1/2 v/v/v) durant 6 h à 100°C<sup>[189]</sup>. Selon d'autres auteurs, ce dernier malgré l'avantage de l'utilisation du TFA volatile, cet acide ne permet pas l'hydrolyse complète de tous les sucres. Pour cela ils ont été remplacés par l'acide chlorhydrique 3N, durant 3H à 100°C<sup>[190]</sup>, ou l'acide sulfurique à 0,5 N, durant 9 H à 100°C<sup>[191]</sup> ou à 2N, durant 3H à 100°C. Toutefois, ces derniers sont trop



destructeurs ils ont été substitués par Dowex 50X2 sous sa forme protonée dans de l'acide chlorhydrique 0,02N pendant 40H<sup>[192]</sup>.

La stabilité de certaines liaisons glycosidiques requiert pour leur hydrolyse totale des conditions drastiques (notamment en ce qui concerne la force de l'acide), ce qui conduit à la destruction de certains sucres. Des protocoles ont été développés afin éviter cette destruction, le recours à quatre hydrolyses différentes successives pour libérer séparément les sucres neutres, les hexosamines, les acides hexuroniques et les acides sialiques, entrecoupées par des étapes longues et fastidieuses de neutralisation et de séparation des sucres libérés. Ainsi il est difficile de contrôler avec certitude toutes les étapes de la technique.

Actuellement il existe une méthode alternative de libération des sucres qui est privilégiée à l'hydrolyse : la méthanolyse. Elle permet la formation de méthyl-glycosides par la fixation d'un groupement méthoxy sur le carbone 1 (ou 2 pour l'acide sialique), par l'utilisation de méthanol-HCl anhydre (de 1 à 2N) sur une durée comprise entre 3 et 24H à une température de 80 à 100°C. D'autres méthodes utilisent des normalités moins élevées en allongeant le temps de réaction 0,5N pendant 20H à 80°C, ou 0,625N pendant 16H à 70°C<sup>[193]</sup>.

La méthanolyse présente de nombreux avantages par rapport à l'hydrolyse. Elle semble aussi efficace en ce qui concerne le taux de libération des monosaccharides sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des produits très acides, car une normalité de 0,5 à 2N est tout à fait suffisante pour libérer en une seule étape la totalité des monosaccharides. Ainsi un test effectué sur du N-acétylchitobiose (GlcNAc  $\beta$ (1,4) GlcNAc) connu parmi les liaisons osidiques les plus résistantes, s'est montré fort concluant. En outre, il est toujours possible de faire des doubles étapes de méthanolyse entrecoupées par une étape de dérivation dans le cas de liaisons particulièrement solides, sans que cela n'implique une dégradation des glycosides libérés lors de la première méthanolyse<sup>[193]</sup>. En effet, la méthanolyse cause beaucoup moins de dégradations des sucres que l'hydrolyse acide.

## **7.4 Méthodes d'analyse des glycoprotéines**

L'analyse des glycannes des protéines est compliquée par leur diversité et leur grand nombre de combinaisons potentielles de glycosylation. En sachant qu'une seule protéine peut subir un nombre important de N et O-glycosylations et qu'un même site de glycosylation peut être occupé par différents types de glycannes ce qui génère un phénomène de microhétérogénéité. La caractérisation fiable et élaborée des glycannes nécessite souvent l'utilisation de plusieurs méthodes.

### **7.4.1. Détection de glycoprotéines**

Deux types de méthodes sont généralement utilisés pour la détection des protéines glycosylées.

#### **7.4.1.1. Méthode de fixation et coloration**

C'est une méthode fondamentale et simple pour déterminer si une protéine est glycosylée. Elle permet la séparation sur gel SDS-PAGE et sa coloration pour son identification par rapport à un standard de glycoprotéines. La plupart des gels de fixation utilisent la réaction à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui oxyde deux groupes hydroxyles porté par deux carbones adjacents pour former un aldéhyde qui réagit avec le réactif de Schiff pour donner une coloration magenta<sup>[194]</sup>. Ce gel coloré et le plus souvent trompé dans la fuchsine acide qui émit une fluorescence à 535 nanomètre, cette technique est sensible deux à quatre fois plus que la méthode de coloration lu dans le visible<sup>[195]</sup>. Quelques produits fluorescents disponibles utilisant l'oxydation de l'acide périodique pour fixer un hydrazide fluorescent sans passage par une réaction de réduction. Ces méthodes fluorescentes sont largement sensibles et détectant une quantité <18 ng des glycoprotéines<sup>[196]</sup>. Cependant, les méthodes d'oxydation de l'acide périodique peuvent être problématiques, puisque des réactions non spécifiques peuvent se produire avec les protéines qui possèdent des groupements endogènes oxydables comme les aldéhydes ou les cétones. De plus, l'intensité du signal est basse pour les protéines avec peu de sites de glycosylation mais plus de structures de branchement des glycannes que pour les protéines fortement glycosylées. Deux autres méthodes de fixation sur gel utilisant le bleu alcian et Stains-All pour détecter les protéoglycannes, les glycosaminoglycannes et les glycoprotéines chargées négativement. Cependant, il faut garder à l'esprit la présence des réactions non spécifiques à des phosphoprotéines et autres protéines chargées négativement.

#### **7.4.1.2 Méthode de détection par affinité**

Ces méthodes sont plus spécifiques et facilitent la détermination du type de la glycosylation.

##### **7.4.1.2.1 Méthode aux Lectines**

Ces méthodes utilisent des protéines (retrouvées chez les animaux, les plantes et les micro-organismes) qui se lient spécifiquement au mono ou oligosaccharides<sup>[197]</sup>. De nombreuses méthodes basées sur les lectines ont été développées pour la détection et la caractérisation de glycoprotéine (Tableau :5). La plus couramment adoptée sépare un échantillon de protéine sur un gel SDS-PAGE et le transfère sur une membrane de fluorure de nitrocellulose ou de polyvinylidène (PVDF). La membrane est alors incubée avec une lectine spécifique marqué par la digoxigénine (DIG) ou la biotine qui se fixe respectivement à un anticorps secondaire ou à l'avidine<sup>[198]</sup>. L'anticorps ou l'avidine

est conjugué à une enzyme qui catalyse une réaction coloré (phosphatase alcaline) ou une réaction luminescente plus sensible (Horseradish peroxidase).

**Tableau 5** : Lectines et leurs affinités spécifiques pour les glycanes.

Lectin	Origin	Specific affinity
<b>Mannose binding lectins</b>		
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	Branched $\alpha$ -mannosidic structures: high-mannose type, hybrid type and biantennary complex type <i>N</i> -glycans
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	$\alpha$ 1-3 and $\alpha$ 1-6 linked high mannose structures
LCH	<i>Lens culinaris</i>	Fucosylated core region of bi- and triantennary complex type <i>N</i> -Glycans
<b>Galactose / N-acetylgalactosamine binding lectins</b>		
RCA	<i>Ricinus communis</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
ECL	<i>Erythrina cristagalli lectin</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (T-Antigen)
AIL	<i>Artocarpus integrifolia</i>	(Sia)Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (T-Antigen)
VVL	<i>Vicia villosa</i>	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr (Tn-Antigen)
<b>Sialic acid / N-acetylglucosamine binding lectins</b>		
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc, Neu5Ac (sialic acid)
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	N-acetylglucosamine
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal(NAc)-R
MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
<b>Fucose binding lectins</b>		
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc $\alpha$ 1-2Gal-R
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3/4)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; R <sub>2</sub> -GlcNAc $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-6)GlcNAc-R <sub>1</sub>

#### 7.4.1.2.2 Méthode Enzymatique

Ces méthodes utilisent des enzymes spécifiques. Elles peuvent être employées pour marquer et isoler les protéines glycosylées. Par exemple, une protéine qui possède une liaison O- $\beta$ -GlcNAc acétylé ou qui porte une liaison O- $\alpha$ - et/ou N-glycanes avec un résidu GlcNAc terminal (à l'état pur ou dans un mélange de protéine) est incubée avec GALT  $\beta$ (1.4)galactosyltransferase qui ajoute spécifiquement un azido-galactose à GlcNAc. Ceci permet alors à l'O-GlcNAc modifié de réagir avec

un alkyle fluorescent. L'échantillon est séparé sur gel SDS-PAGE et la protéine modifiée est visualisée par lecture densitométrique dans l'UV<sup>[195]</sup>. De même, des peptides O-GlcNAcetylés peuvent être marqués et analysés par spectrométrie de masse (MS).

#### **7.4.1.2.3 Méthode basée sur des anticorps**

L'O- $\beta$ -GlcNAc peut être analysé par une méthode qui est spécifique à la seule partie glycanique par des anticorps (exemple, CTD 110.1 et RL2 disponible dans le commerce) qui ont été développés. En réagissant avec des anticorps secondaires conjugué à des enzymes qui catalysent une réaction coloré ou une réaction lumineuse peuvent être exploitée dans des protocoles pour détecter les protéines O-GlcNAcetylé<sup>[198]</sup>.

### **7.5 Procédés de libération des glycannes**

La libération des glycannes des glycoprotéines est une étape incontournable, du fait que la chaîne peptidique est susceptible d'interférer soit dans l'application d'une méthode physique comme la RMN soit dans celle d'un procédé chimique comme la perméthylation. Dans certains cas particuliers, une protéolyse poussée jusqu'au stade de glyco-aminoacides ou de glyco-oligopeptides est envisageable. La libération des glycannes par coupure des liaisons O- et N-glycosidiques peut être réalisée par méthodes chimiques ou enzymatiques.

#### **7.5.1 Méthodes chimiques**

##### **7.5.1.1 Hydrazinolyse**

La méthode de libération des glycannes par hydrazinolyse concerne essentiellement les N-glycosylprotéines. Elle dérive de la méthode d'Akobori pour l'identification des acides aminés terminaux libérés d'une protéine qui sont sous forme d'hydrazides. En effet, l'action de l'hydrazine porte sur les liaisons peptidiques ou de type glycosylamine. Dans le cas des N-glycosylprotéines, les liaisons acétamido des résidus de N-acétylglucosamine et d'acides sialiques sont elles aussi coupées et l'action de l'hydrazinolyse devra être suivie par une N-réacétylation des monosaccharides aminés.

Le procédé comprend donc 3 étapes : hydrazinolyse, N-réacétylation et réduction du monosaccharide en position terminale afin de stabiliser les molécules de glycannes<sup>[199]</sup>.

##### **7.5.1.2 Coupure alcaline**

L'attaque alcaline de la liaison glycanne-protéine ne concerne que les glycannes conjugués N- et O-glycosidiques à condition que pour ces derniers, seuls les  $\beta$ -hydroxy-amino acides, sérine et thréonine soient impliqués dans la liaison.

- Dans le cas des N-glycosylprotéines La coupure alcaline de la liaison N-glycosidique nécessite des conditions plus drastiques que dans le cas des O-glycosylprotéines (NaOH 1M, 100°C pendant 6 à 12H).

- Dans le cas des O-glycosylprotéines L'attaque par la soude ou la potasse s'effectue dans des conditions douces (pH 10 ; 40-45°C pendant à 6 à 12H) et en présence d'un agent réducteur destiné à stabiliser la molécule par transformation en alditol du monosaccharide en position terminale réductrice pour éviter une dégradation récurrente.

- La libération des glycannes liés par des liaisons N- et O-glycosidique de la même protéine s'effectue en deux temps :

1) Clivage spécifique des liaisons O-séryl ou thréonyl par  $\beta$ -élimination.

2) Chromatographies par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2 pour séparer les oligosaccharide-alditols des N-glycosylpeptides, suivie de la libération des N-oligosaccharide-alditols soit par hydrolyse alcaline, soit par hydrazinolyse<sup>[182]</sup>.

## 7.5.2 Méthodes enzymatiques

Parmi les hydrolases, la famille des glycosidases possède la propriété de couper les liaisons glycosidiques de deux manières.

- Soit en s'attaquant au monosaccharide en position terminale non-réductrice et il s'agit alors des exoglycosidases.

- Soit en coupant à l'intérieur même de la molécule de glycanne dans le cas des endoglycosidases. C'est cette seconde catégorie d'enzymes qui sont utilisée pour libérer la totalité ou une partie des glycannes.

Un glycanne complet est libéré en cas des endoglycosidases de la classe I telle que peptide-N-glycosidase ou N-glycanase F de *Flabobacterium meningosepticum* et N-glycopeptidase A de l'émulsine d'amande. Un glycanne amputé du résidu terminal de N-acétylglucosamine est libéré sous l'action des endoglycosidases de la classe II comme « l'endo-B » spécifique des structures de type N-acétyllactosaminique bi-antennées désialylées et « l'endo-H » spécifique des structures oligomannosidiques<sup>[184]</sup>.

### 7.5.2.1 Coupure par les peptide-N-glycosidases

Ces endoglycosidases hydrolysent les liaisons GlcNAc-Asn aussi bien des glycoasparagines que des glycopeptides et des glycoprotéines à condition toutefois que ces dernières soient préalablement dénaturées par la chaleur. Bien que leurs paramètres optimaux d'activité soient différents (pH 6,5 à 9,5 et T<sup>0</sup> 25°C pour la glycanase F ; pH 4 à 6 et T<sup>0</sup> 37°C pour la N-

glycopeptidase A) leurs spécificités sont identiques et très larges. Elles sont actives sur les glycannes de types oligomannosidique, hybride, N-acétyllactosaminique bi-, tri- et tétra-antennés, même si le résidu terminal de N-acétylglucosamine est fucosylé en position C-6<sup>[186]</sup>.

#### **7.5.2.2 Coupure par les endo-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases**

Ces enzymes constituent une famille très homogène d'endoglycosidases puisqu'elles possèdent toutes la propriété de rompre la liaison  $\beta$  (1,4)-N-acétylglucosaminique des résidus de N,N'-diacétylchitobiose présents dans tous les noyaux pentasaccharidiques des N-glycosylprotéines. Toutefois, elles se distinguent par des spécificités différentes liées aux structures oligosaccharidiques substituant le noyau. À cet égard, elles sont réparties en deux groupes principaux :

- Le groupe I avec l'endo-H de *Streptomyces plicatus* et l'endo-F1 de *Flavobacterium meningosepticum*, actives sur les glycannes de type oligomannosidique et hybride,
- Le groupe II avec l'endo-B de *Sporotrichum dimorphosporum* et les endo-F2 et F3 de *Flavobacterium meningosepticum*, actives sur les glycannes de type oligomannosidique <sup>[185]</sup>.

Ces enzymes sont actives sur les glycoasparagines, sur les glycopeptides et sur les glycoprotéines de préférence dénaturées. Dans le cas où des glycannes de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique coexistent dans la même protéine, les oligosaccharides libérés par l'endo-H peuvent être séparés par chromatographie de tamisage moléculaire (colonne de Bio-Gel P2) de la glycoprotéine résiduelle dont les glycannes de type N-acétyllactosaminique peuvent être rompus soit par coupure chimique, soit par hydrolyse enzymatique à l'aide d'une peptide-N-glycosidase<sup>[183]</sup>.

## 8. La spectrométrie de masse appliquée à l'étude de biomolécules

### 8.1 Généralités sur la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de fragmentation moléculaire qui donne accès à des informations importantes sur les molécules d'un échantillon. Elle permet la mesure de la masse moléculaire d'une substance et d'obtenir des données sur sa structure. Cette dernière détermine les rapports masse/charge ( $m/z$ ) de molécules ionisées ainsi que de leurs produits de fragmentation. La MS fournit donc des informations qualitatives et quantitatives de la composition atomique et moléculaire.

Le principe de la spectrométrie de masse (MS) repose sur le déplacement de particules chargées dans un champ électromagnétique dans un vide poussé. Elle consiste à la détermination de rapports masse/charge ( $m/z$ ) des ions en phase gazeuse. Les analytes doivent alors être au préalable ionisés et vaporisés.

Le spectromètre fonctionne dans des conditions de pression allant de la pression atmosphérique au niveau de la source d'ionisation à un vide poussé au niveau de l'analyseur. Le vide est nécessaire pour optimiser la transmission des ions jusqu'au détecteur sans qu'ils subissent de collisions avec les molécules gazeuses. En effet, les collisions peuvent entraîner une déviation de la trajectoire des ions, qu'ils iraient se décharger sur la paroi de l'appareil. Les collisions peuvent également être à l'origine de réactions de fragmentation qui compliquent le spectre. Le système d'introduction d'échantillon est conçu pour une optimisation maximale du vide. La source d'ions crée des ions gazeux à partir de l'échantillon.

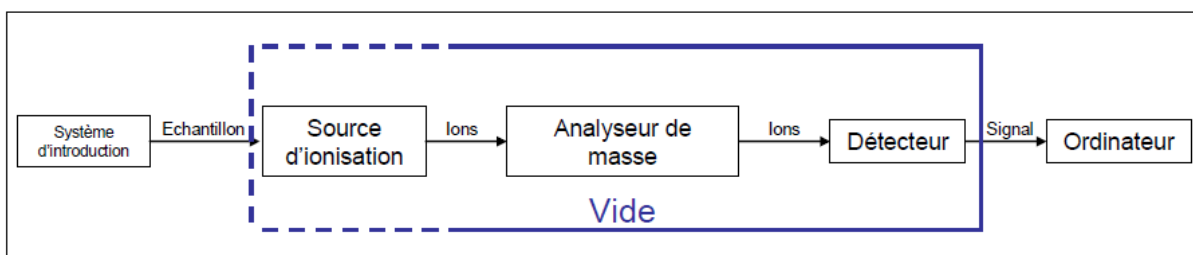
De façon générale, un spectromètre de masse se compose de trois régions distinctes où se déroulent successivement les étapes nécessaires à l'analyse des ions (Figure : 18) :

- La source où se produisent l'ionisation-désorption des analytes (MALDI) ou la vaporisation (ES).
- L'interface qui assure la transmission des ions depuis la source vers l'analyseur grâce à un gradient de pression et / ou de potentiel.
- L'analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ).

#### 8.1.1 Le détecteur

Nous décrirons la source, l'interface et les analyseurs d'appareils opérant en mode d'ionisation MALDI. Nous nous intéresserons principalement aux instruments disponibles qui nous ont été utiles pour développer une approche analytique par spectrométrie.

Ces configurations variables d'appareils permettent l'analyse d'échantillons de nature différente. Elles sont également adaptées ou non à la réalisation d'expériences dites de MS/MS qui servent généralement à apporter des informations sur les objets étudiés en les fragmentant dans un second spectromètre de masse. Les techniques de fragmentations sont variées (dissociation Induite par collision (CID), dissociation par capture d'électrons (ECD) dissociation par transfert d'électron (ETD) et permettent d'obtenir différentes informations.



**Figure 18 :** Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse.

### 8.1.2 Les sources d'ionisation

La source d'ionisation a une double fonctionnalité. Premièrement formation d'un faisceau d'ions représentatif de l'échantillon et deuxièmes l'accélération de ces ions formés par des champs électromagnétiques vers l'analyseur. Jusqu'aux années 80, l'ionisation des molécules était réalisée par des sources d'ionisation de type impact électronique (EI) ou de type ionisation chimique (CI) (Annexe 1 : Tableau : 23). Ces techniques sont, cependant limitées à l'analyse de composés organiques, apolaires, volatiles thermorésistants et de faible masse moléculaire (< 1,2 kDa). Elles conduisent à une série de fragmentations des analytes, soit par des processus de collisions très énergétiques (EI) ou soit par instabilité chimique (CI). Les biomolécules, composés bioorganiques polaires, thermolabiles et de masse moléculaire élevée ne peuvent donc pas être ionisées par ces méthodes. La plus grande révolution a été vers la fin des années 80, avec l'introduction de deux principales méthodes d'ionisation, dite douce : technique d'électrospray (ESI)<sup>[200][202]</sup> et technique d'ionisation et de désorption laser assistée par matrice (MALDI)<sup>[201]</sup>. Ces techniques d'ionisation permettent l'analyse de macromolécules biologiques intactes et ont ouvert de nouvelles perspectives dans la caractérisation des biomolécules.

L'ESI produit un plasma d'ions en phase gazeuse par désorption des analytes en solution sous l'effet d'un champ électrique intense (3-5 kV) rendant possible le couplage de cette méthode d'ionisation avec chromatographie liquidienne haute performance ou d'électrophorèse capillaire. La technique MALDI quant à elle, permet la désorption et l'ionisation d'analytes en phase condensée,



préalablement cocrystallisés en présence d'une matrice cristalline aromatique sur une surface métallique (la cible) et sous l'effet d'une irradiation pulsée par un laser (UV).

Ces sources d'ionisation présentent le grand avantage de générer des signaux correspondant à des espèces moléculaires différentes avec très peu de fragmentation générant ainsi des masses moléculaires de différents composés présents dans l'échantillon. L'ionisation MALDI présente néanmoins l'avantage de générer des ions moléculaires principalement monochargés, tandis que l'ionisation ESI génère des ions moléculaires multichargés, pouvant compliquer l'interprétation des spectres de masse. La sensibilité de ces sources d'ionisation, en particulier celle de la source ESI peut être considérablement altérée par la présence de sels dans l'échantillon d'où la nécessité d'inclure une étape de dessalage avant son analyse MS.

Enfin quelle que soit la méthode MS utilisée, les analytes sont détectés sur le spectre de masse sous la forme de distribution de signaux d'ions moléculaires isotopiques, caractérisés par la présence d'un certain nombre d'isotopes des atomes les moins abondants dans la nature ( $C^{13}$ ,  $H^2$ ,  $S^{34}$  ...). Les ions produits par les sources MALDI et ESI peuvent être formés soit par protonation/déprotonation de sites basiques/acides  $[M+nH]n^+$  et  $[M-nH]n^-$  (protéines, peptides), soit par complexation avec des adduits métalliques alcalins et monovalents tels que le sodium (Na)  $[M+nNa]n^+$ ,  $[MnH+(n+m)Na]m^+$  (oligosaccharides), et seront qualifiés alors de pseudo moléculaires.

### 8.1.3 Les analyseurs

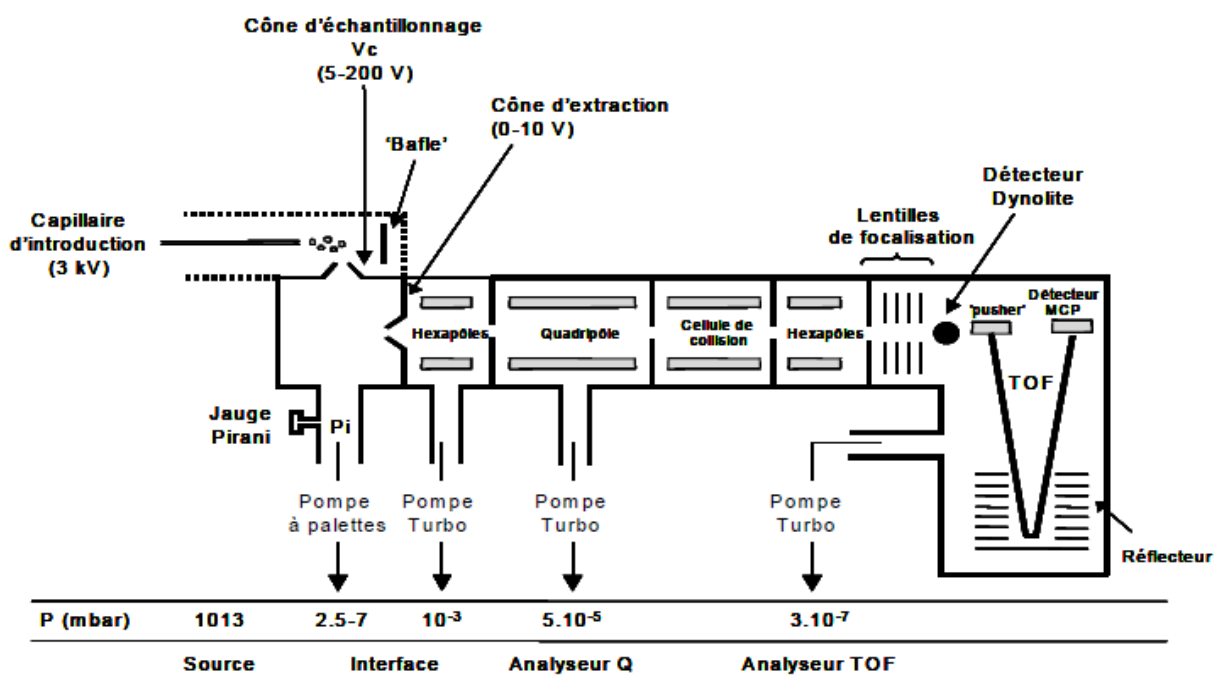
Une grande variété d'analyseurs peut être couplée aux sources d'ionisation ESI et MALDI. Les paramètres instrumentaux nécessaires à l'évaluation de leur performance et de leur utilité sont la résolution, la précision en masse, la gamme de masse et la sensibilité (Annexe : 1 ; Tableau : 24). Jusqu'à l'heure actuelle, quatre types d'analyseurs sont communément utilisés dans des approches de glycomique. L'analyseur quadropolaire (Q), l'analyseur en temps de vol (TOF), l'analyseur en trappe ionique quadropolaire (linéaire ou tridimensionnelle, IT) et l'analyseur par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FTICR).

Cependant, la compatibilité de ces analyseurs avec les sources ESI ou MALDI est variable. Il existe deux analyseurs communément couplés avec la source MALDI qui se caractérisent par la formation d'un faisceau discontinu d'ions moléculaires. Il s'agit des analyseurs TOF et FTICR. L'analyseur TOF est actuellement l'analyseur le plus répandu contrairement à l'analyseur FTICR qui possède une haute résolution et très onéreux par conséquent.

La résolution et la précision en masse des spectromètres équipés d'un analyseur TOF ont été considérablement améliorées avec le développement de la technique d'extraction retardée qui réduit le nombre et l'énergie des collisions dans la source MALDI. De plus l'introduction de réflecteurs électrostatiques ou réflectron qui refocalisent l'énergie cinétique des ions durant leur temps de vol. Ces derniers développements permettent aux spectromètres MALDI-TOF de détecter quelques attomoles de peptides avec une précision en masse de l'ordre de quelques dizaines de ppm.

### 8.1.4 La spectrométrie de masse en tandem

Les spectromètres de masse en tandem peuvent utiliser deux ou plusieurs analyseurs dans diverses configurations lors d'expériences MS/MS et permettant ainsi l'obtention d'informations structurales plus précises.



**Figure 19 :** Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) à deux analyseurs.

Le principe de la MS/MS repose sur la sélection d'ions moléculaires précurseurs, à une valeur de  $m/z$  donnée ( $\pm \delta m/z$ ) grâce au premier analyseur, suivie de la fragmentation en ions fragments (ions fils) par le second analyseur (Figure : 19). Les ions précurseurs et les ions fragments peuvent être séparés dans la configuration espace en combinant deux analyseurs du même type ou de géométrie hybride, ou dans la configuration temporelle en réalisant plusieurs étapes de sélection/fragmentation avec un même analyseur qui fonctionne comme un piège ionique. Selon le

type d'analyseur utilisé, il existe plusieurs méthodes de transfert d'énergie interne aux ions moléculaires précurseurs pour induire leur décomposition.

La méthode la plus communément utilisée consiste en l'introduction entre deux analyseurs spatiaux d'une cellule de collision renfermant un gaz inerte sous pression (argon ou diazote) avec lequel les ions moléculaires sélectionnés entrent en collision (CID).

L'analyseur triple quadripolaire (Q1qQ2) couplé à une source d'ionisation ESI est l'un des appareils les plus utilisés pour les expériences MS/MS. D'autres analyseurs, de géométrie hybride peuvent combiner les caractéristiques spécifiques de chacun d'entre eux pour des analyses MS/MS de qualité supérieure. C'est le cas, par exemple, des analyseurs en tandem hybride Q/TOF et Q/LIT qui sont généralement couplés à une source nano-ESI et qui sont séparés par un quadripolaire (Q) pour la sélection d'ions précurseurs. Par ailleurs, des expériences de MS en tandem, permettant la réalisation de plusieurs étapes de sélection de fragmentation ( $n < 6$ , IT et  $n < 4$ , FTICR) qui peuvent être conduites en utilisant qu'un seul analyseur temporel et ceci grâce à leur capacité à piéger les ions moléculaires d'intérêt à une valeur de  $m/z$  donnée (les autres ions moléculaires étant éjectés de l'analyseur). Ainsi, les ions piégés dans les analyseurs IT et FTICR sont ensuite fragmentés par collision soit avec des molécules de gaz neutre en mode CID soit avec des électrons de faible énergie en mode (ECD) sur les analyseurs FTICR ou en mode (ETD), sur les analyseurs IT.

Les ions fragments générés dans ces pièges ioniques sont enfin analysés et l'expérience peut ainsi être répétée en ne piégeant que les ions fragments à un rapport  $m/z$  donné pour les soumettre à nouveau à une autre fragmentation.

Quelle que soit la méthode MS en tandem utilisée, la fragmentation des peptides et des glycanes se localise préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques et interglycosidiques. L'analyse des rapports  $m/z$  des ions fragments par incrémentation de masse permet dans la majorité des cas de déterminer la séquence primaire en acides aminés ou en monosaccharides des peptides ou des oligosaccharides, respectivement.

## 8.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

### 8.2.1. Introduction

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, est actuellement incontournable et peut être appliquée à l'étude d'une large gamme de molécules d'intérêts biologiques. Elle permet de travailler sur une grande gamme de  $m/z$  (en pratique jusqu'à environ 500 kDa) avec une bonne précision de mesure, une mise en œuvre assez simple et une tolérance relative vis à vis des sels et des tampons peu volatils (Tableau : 6). La MALDI est devenue l'approche de choix pour l'étude de molécules de hauts poids moléculaire comme les biopolymères (peptides, protéines, oligonucléotides...) et les polymères synthétiques. Les spectres obtenus sont principalement composés d'ions monochargés qui simplifient l'analyse. Quelques espèces di- ou tri-chargées peuvent également être observées.

**Tableau 6** : Concentrations de différents contaminants tolérés par la technique MALDI-TOF.

Contaminant	Concentration maximale tolérée
Urée	0,5M
Guanidine-HCl	0,5M
Dithiotréitol	0,5M
Glycérol	1%
Tampon Tris	0,05M
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,05M
Tampon Phosphate	0,01M
Détergent (sauf SDS)	0,1%
SDS	0,01%

Le mécanisme d'ionisation / désorption laser assistée par matrice (MALDI) a été introduit par Karas et Hillenkamp<sup>[201]</sup> et au même moment, par une équipe japonaise<sup>[202]</sup>. La technique MALDI consiste à irradier avec un faisceau laser pulsé de longueur d'onde donnée un dépôt cristallin contenant une matrice organique et l'échantillon à analyser. (Tableau : 7)

**Tableau 7** : Liste des différents lasers utilisés pour l'ionisation MALDI. [thèse Cavusoglu].

Laser	Longueur d'onde nm	Energie des photons eV	Durée de l'impulsion ns
Azote	337 (UV)	3,68	< 1
4Nd:YAG x3	355	3,49	5
Nd:YAG x4	266	4,66	5
Er: YAG	2,94 $\mu$ m (IR)	0,42	85
CO <sub>2</sub>	10,6 $\mu$ m	0,12	100

## 8.2.2 La matrice MALDI

La première étape d'une analyse par MALDI-MS consiste à co-cristalliser une faible quantité de molécules à analyser avec une grande quantité de molécules de matrice. Celle-ci doit avoir la propriété d'absorber par résonance à la longueur d'onde du laser.

La matrice a un rôle de protection de l'échantillon soumis aux effets destructeurs du faisceau laser incident. Elle permet également de transférer une partie de l'énergie du laser aux analytes pour former les ions en phase gazeuse.

La technique consiste à mélanger préalablement à la solution contenant l'échantillon, une solution saturée de matrice. Le mélange est déposé sur la cible et évaporé sous vide ou à l'air afin qu'il cristallise. Les cristaux produits sont relativement de grande taille et hétérogènes ce qui peut influencer sur la résolution et la reproductibilité des résultats. Il existe deux méthodes de dépôts, la première sur couche mince et la seconde en sandwich. (Annexe : 1 ; Figure : 53 et 54)

Les supports utilisés pour le dépôt sont généralement en métal inoxydable (souvent à base d'aluminium), conducteur et traité en surface de manière à être chimiquement inerte par rapport à l'échantillon. Il existe également des cibles en verre recouvertes d'une couche de métal conducteur. Les dépôts sont hétérogènes, ce qui conduit l'utilisateur à accumuler un grand nombre de tirs laser en balayant la surface du dépôt pour obtenir un spectre de masse représentatif de l'échantillon. Il en découle une sensibilité accrue et une meilleure reproductibilité des tirs<sup>[205]</sup>.

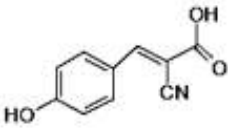
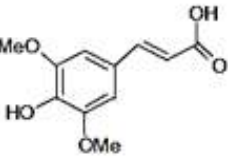
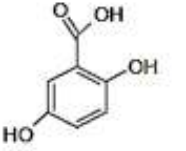
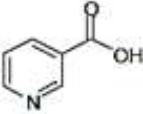
Une nouvelle technologie dite « AnchorChip » (développée par Bruker Daltonics) a permis d'augmenter la sensibilité des analyses de 10 à 100 fois<sup>[206]</sup>. Les cibles « AnchorChip » sont couvertes d'un revêtement hydrophobe à base de téflon sur lequel se répartissent des sites hydrophiles appelés « ancras » de faible diamètre (200 à 600  $\mu\text{m}$ ).

Il n'existe pas de matrice « universelle ». La matrice doit former des cristaux incluant l'analyte. Elle doit être soluble dans les solvants utilisés pour dissoudre l'échantillon et doit absorber à la longueur d'onde du laser. Parmi les matrices les plus communément utilisées, on distingue<sup>[203]</sup>: (tableau : 8)

- L'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA) qui permet l'analyse des peptides et des protéines.
- L'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB) qui permet d'analyser les oligosaccharides, les glycoprotéines, les lipides, les peptides et les protéines.
- L'acide sinapinique (SA) pour les peptides, les protéines et les glycoprotéines.

Certaines techniques de préparation font appel à l'utilisation d'une co-matrice qui influence la qualité de l'analyse en termes de résolution, de sensibilité, et de reproductibilité. C'est le cas des sels d'ammonium dans les dépôts en DHB ou  $\alpha$ -CHCA qui améliorent le signal pour l'analyse des peptides et des oligonucléotides<sup>[204]</sup>.

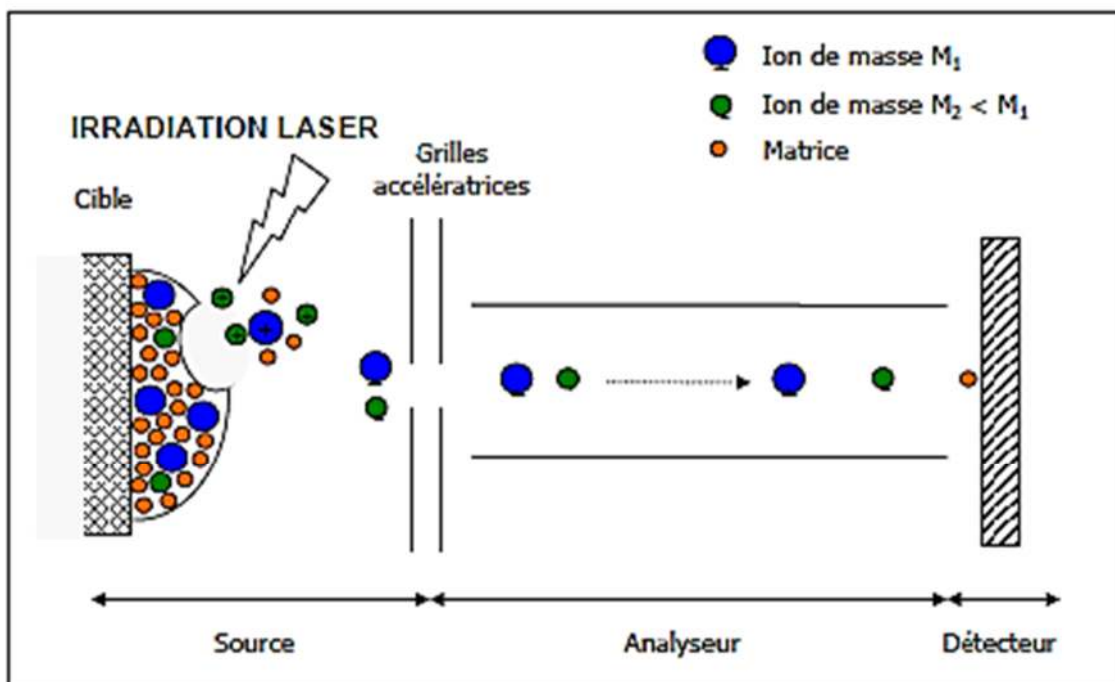
**Tableau 8** : Matrices les plus couramment utilisées pour l'étude de biomolécules en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Noms	Structures	Longueurs d'ondes d'absorption	Applications courantes
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique		266, 337 et 355nm (UV)	Peptides et protéines
Acide sinapinique		337 et 355nm (UV)	Protéines
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque		266, 337 et 355nm (UV)	Oligosaccharides, glycopeptides et glycoprotéines
Acide nicotinique		266nm (UV)	Protéines

### 8.2.3 Le mécanisme d'ionisation MALDI

Le processus d'ionisation MALDI s'effectue sous vide ( $\approx 10^{-7}$  mbar). Les ions sont produits en phase gazeuse sous l'effet d'une impulsion laser qui irradie la surface cristalline contenant la matrice et l'échantillon à analyser. Ils sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre appelée aussi lentille d'extraction. Les phénomènes d'ionisation MALDI ne sont toujours pas très bien compris. Plusieurs modèles ont été proposés mais de nombreuses ambiguïtés concernant certains aspects de ce processus subsistent. Selon les hypothèses les plus communément admises, il serait constitué de trois événements majeurs (Figure : 20) :

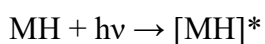
- L'excitation des molécules de matrice par les photons du laser.
- L'émission des molécules cibles dans la phase gazeuse.
- L'ionisation des molécules en phase gazeuse.



**Figure 20** : Mécanisme d'ionisation MALDI. (De Hoffmann & Stroobant, 2003)

### 8.2.3.1 Excitation des molécules de matrice

Après irradiation laser, les molécules de matrice notées MH (notation indiquant la présence d'un atome d'hydrogène labile) sont excitées par absorption résonnante de photons ( $h\nu$ ).



L'excès d'énergie interne emmagasinée par les molécules de matrice excitées  $[\text{MH}]^*$  peut être redistribué immédiatement à la molécule cible mais peut également provoquer la fragmentation de cristaux de matrice.

### 8.2.3.2. Emission des ions en phase gazeuse

Cette redistribution d'énergie abaisse les forces de cohésion des cristaux et provoque une coéjection de molécules de matrice et de molécules cibles dans la phase gazeuse. Le gaz très dense qui résulte de cette éjection de matière subit une expansion adiabatique dans le vide sous forme d'un jet supersonique formant ainsi l'aspect d'une plume caractéristique<sup>[207]</sup>.

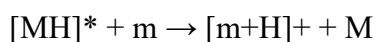


### 8.2.3.3 Ionisation des molécules en phase gazeuse

Il semblerait que l'ionisation des analytes s'effectue dans ce gaz en suspension. L'état des connaissances sur cet aspect du processus MALDI, encore mal défini a été résumé par Zenobi et Knochenmuss<sup>[208]</sup>. Sous forme de deux hypothèses :

- L'ionisation pourrait se produire par transfert d'un proton lorsque les ions de matrice entrent en collision avec la molécule cible en phase gazeuse.

- L'ionisation pourrait être le résultat d'une réaction acide/base entre la molécule cible (m) et des molécules de matrice excitées [MH]\*.



Par conséquent, contrairement à l'ionisation ES, la plupart des ions observés en MALDI sont monochargés.

### 8.2.4 L'analyseur à temps de vol

La source MALDI est en général couplée à un analyseur à temps de vol qui est bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser. Le mode d'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés pour lesquels l'analyseur TOF offre une gamme de m/z théoriquement illimitée.

Le MALDI peut également être couplé, entre autres, à un analyseur à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier<sup>[209]</sup>, à une trappe ionique<sup>[210]</sup>, à un analyseur à secteur magnétique<sup>[211]</sup>.

#### 8.2.4.1 Le MALDI-TOF linéaire

Les premiers analyseurs à temps de vol ont été décrits par Wiley et McLaren<sup>[212]</sup>. Le principe de base d'un analyseur TOF consiste à mesurer le temps de vol d'un ion (préalablement accéléré dans un champ électrostatique E) au travers d'une région libre dans le tube de vol (Figure : 21).

Dans le cas idéal où les ions ont tous la même énergie cinétique initial E, le temps de vol des ions est proportionnel à la racine carrée de leur rapport masse sur charge (m/z). Soit l'énergie cinétique E<sub>c</sub> d'un ion de masse m et de charge z accéléré dans un champ E avec charge d'un électron e = 1,602 .10<sup>-19</sup> C.

- Les unités sont celles du système international :

$$E_c = zeE = \frac{1}{2} mv^2 \quad (e : \text{charge de l'électron } 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C})$$

La vitesse v de cet ion est donnée par l'équation suivante :

$$v = (2zeE/m)^{1/2}$$

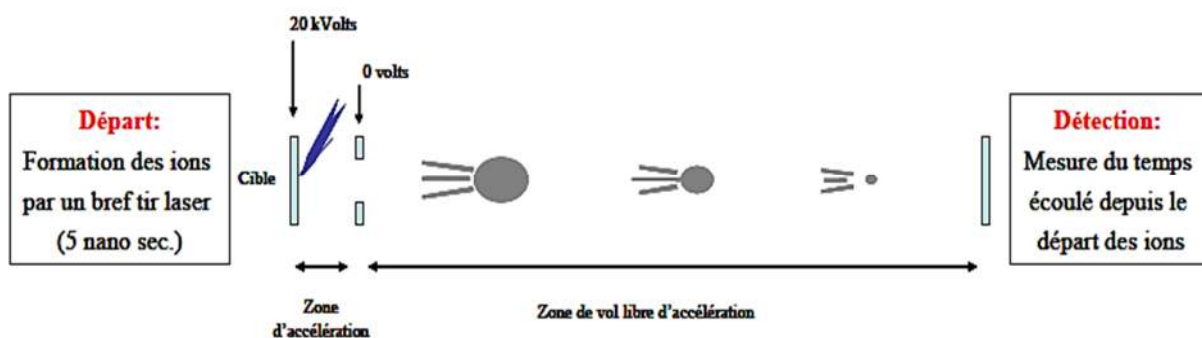
Le temps nécessaire à un ion pour traverser le tube de vol de longueur L,

Sachant que la vitesse  $v = L / t$  peut donc être déduit des équations précédentes :

$$t = L (2zeE/m)^{1/2}$$



Pour un même état de charge un ion de masse élevée passe donc plus de temps dans le tube de vol qu'un ion de masse plus faible. La mesure du temps de vol d'un ion permet ainsi la détermination de son rapport  $m/z$ .



**Figure 21** : Principe de l'analyseur à temps de vol couplé à une source MALDI.

#### 8.2.4.2 Le MALDI-TOF avec réflecteur et extraction retardée

Les ions issus de la source MALDI ne sont pas toujours générés au même moment ni au même endroit. Deux ions de même rapport  $m/z$  n'acquièrent donc pas forcément la même énergie cinétique initiale. Cette dispersion en énergie cinétique initiale affecte la capacité de l'analyseur à distinguer deux ions de  $m/z$  voisins :  $m/z$  et  $m/z + \delta(m/z)$ .

La résolution  $R$  d'un analyseur de masse est donnée par :  $R = m/z / \delta(m/z)$

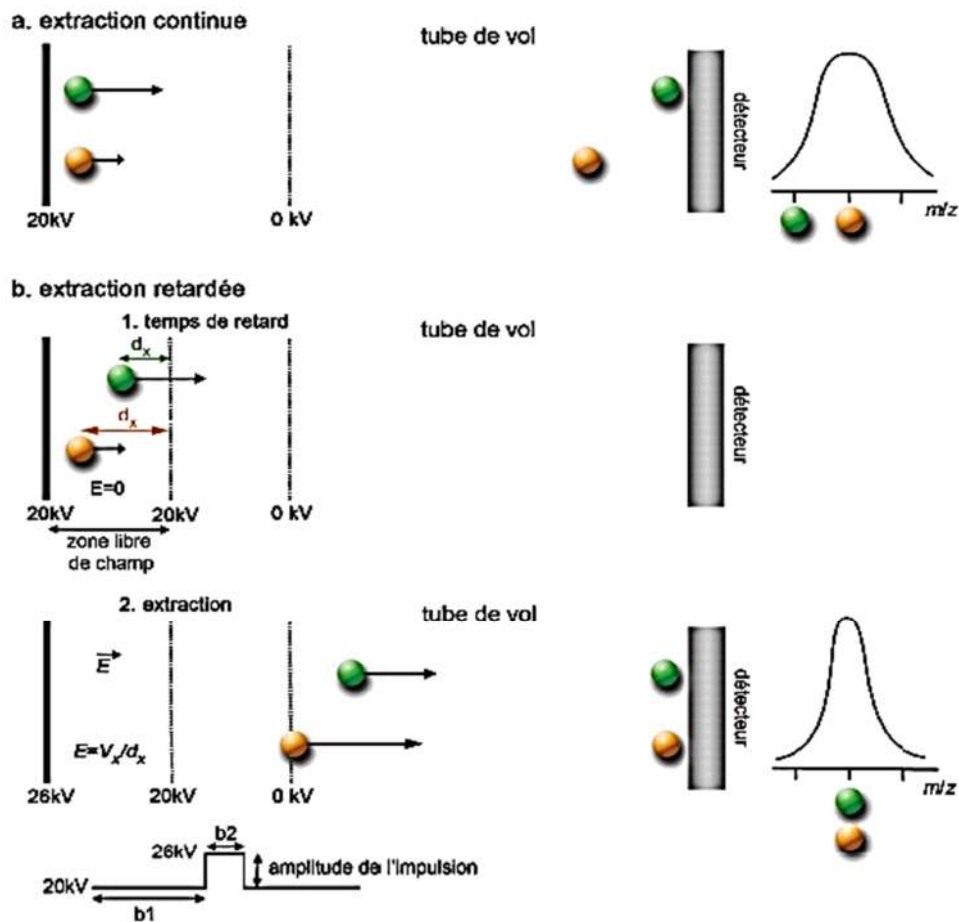
Deux dispositifs peuvent contribuer à améliorer la résolution de l'analyseur :

##### 1) L'extraction retardée (« Delay Extraction DE ») [213][ 214].

Lorsqu'un nuage composé de molécules de matrice et d'analytes est éjecté de la surface du cristal, les ions trouvent une résistance à leur accélération dans le champ électrique appliqué à cause des collisions avec les molécules de matrice. La durée pendant laquelle les ions sont piégés dans le nuage en expansion est proportionnelle à la taille de ce nuage et dépend de l'énergie fournie par le laser. Ces observations ont conduit au développement de la source à extraction retardée.

Cette méthode consiste à introduire après la source, une lentille supplémentaire appelée lentille d'extraction retardée (DE). Pendant un bref délai suivant le tir laser (quelques centaines de nanosecondes) la lentille (DE) est portée à un potentiel légèrement supérieur à celui de la cible s'opposant ainsi à la progression des ions dans l'analyseur ce qui permet la dissipation du nuage gazeux. Les ions sont alors focalisés dans l'espace ; ils se placent sur « une ligne de départ ». Après

le délai qui leur est imposé, ils pénètrent simultanément dans le tube de vol. Ce dispositif va contribuer à minimiser la dispersion en énergie cinétique initiale (Figure : 22).

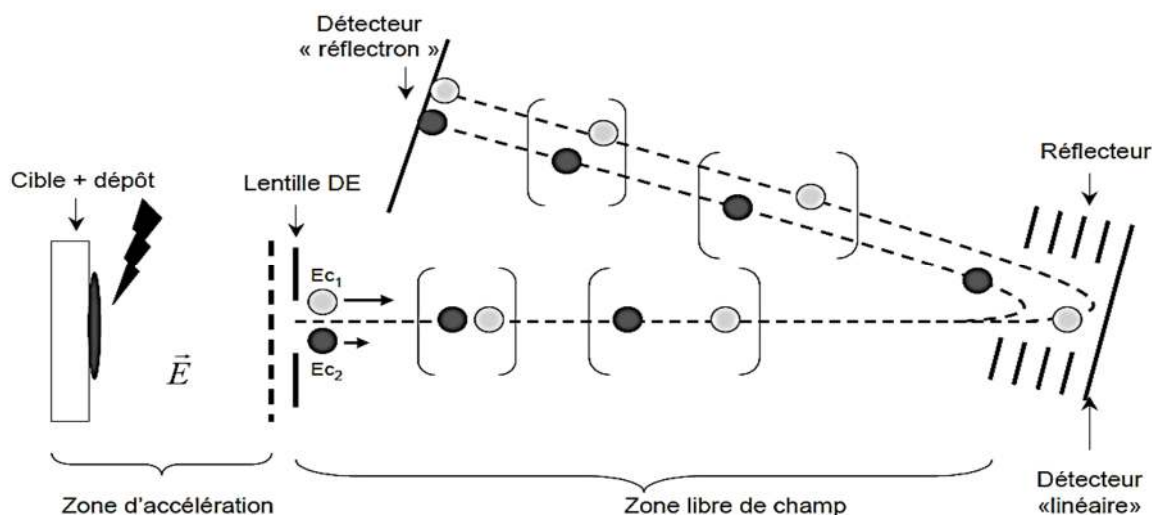


**Figure 22:** Principe de la source à extraction retardée : **a.** l'extraction continue, **b.** l'extraction retardée.

## 2) Le réflecteur électrostatique<sup>[215]</sup>.

Ce réflecteur est situé à l'extrémité du tube de vol et composé d'une série d'anneaux ou de grilles sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants. Il agit comme un miroir électrostatique imposant un champ électrique qui s'oppose à la progression des ions. Les ions retournent et sortent du réflecteur avec une vitesse longitudinale qui est l'inverse de la vitesse initiale. Pour une famille d'ions de  $m/z$  donné, les ions les plus énergétiques pénètrent plus profondément dans le réflecteur et mettent plus de temps à être réfléchis. Par conséquent, leur temps de vol est allongé. De même, les ions de même rapport  $m/z$  arrivent simultanément au détecteur et sont focalisés temporellement. (Figure : 23)

En fin deux ions de même rapport  $m/z$  et d'énergie cinétique différente ( $E_{c1} > E_{c2}$ ) pénètrent plus ou moins profondément dans le réflecteur, sont réfléchis, puis arrivent simultanément au détecteur. Le dispositif permet de porter la résolution d'un ion de  $m/z$  6000 à une valeur supérieure à 10000.



**Figure 23** : Principe d'un spectromètre en temps de vol avec extraction retardée et réflectron couplé à une source MALDI.(Wagner, 2004).

## 8.2.5 La fragmentation en MALDI-TOF

### 8.2.5.1 Le PSD ou « Post Source Decay »

Le processus de dégradation des ions dans le tube de vol [zone libre de champ] est désigné sous le terme PSD pour (Post Source Decay)<sup>[216]</sup>. Les principaux mécanismes d'activation qui sont à l'origine de ce phénomène sont décrits dans le (tableau : 9). Ils concernent essentiellement :

- La dégradation métastable d'ions ayant accumulé beaucoup d'énergie interne sur la cible ou par collisions multiples dans la source.
- La dissociation induite par collisions dans l'analyseur.

**Tableau 9** : principaux mécanismes d'activation rencontrés en PSD [Spengler, 1997].

Zone d'activation	Cible - Surface de l'échantillon	Source - Nuage en expansion	Tube de vol
Processus d'activation	Chaleur Energie d'ionisation	Collisions multiples à basse et haute énergie	Collisions à haute énergie
Echelle de temps	ps - ns	ns-µs	µs-ms
Distance de la cible	0	< 200 µm	> zone accélération

La nature de la matrice semble jouer un rôle important dans le processus PSD. A ce titre, on distingue les matrices « chaudes » c'est à dire les plus énergétiques et les matrices « froides » [217]. Cette classification est corrélée à l'affinité protonique de ces molécules [218]. (Tableau :10).

Pour qu'un transfert de protons puisse se produire, il faut que l'affinité protonique de l'accepteur en l'occurrence l'échantillon soit supérieure à celle du donneur la matrice. Pour les protéines et les peptides, la présence d'une liaison amide d'affinité protonique élevée permet d'obtenir un ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$ . Une matrice de faible affinité protonique comme  $\alpha$ -CHCA est une matrice « chaude » qui peut transférer beaucoup d'énergie. Ce type de matrice favorise la dégradation de l'échantillon après ionisation et est donc appropriée à l'analyse en PSD.

**Tableau 10** : Différentes matrices utilisées en MALDI et leurs applications.

Matrices	Analytes	Affinités protoniques (kJ.mol <sup>-1</sup> )
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)	Peptides Protéines de faibles masses Glycopeptides	841
Acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique) (SA)	Protéines de hautes masses Peptides	887
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique) (DHB)	Peptides Oligosaccharides Glycopeptides	943
Acide 2-hydroxy-4-phénylazobenzoïque	Peptides Protéines Glycoprotéines	943

### 8.2.5.2 Analyse en PSD

Lorsqu'un ion se dissocie pendant son vol dans la zone libre de champ, il génère des fragments de même vitesse mais d'énergie cinétique plus faible. En effet, l'énergie cinétique de l'ion qui se dissocie est redistribuée aux fragments en fractions proportionnelles à leur masse. Ainsi, en mode linéaire les fragments et les précurseurs arrivent simultanément au détecteur. L'analyseur TOF en mode linéaire n'est pas capable de différencier ces fragments.

Pour les analyses en PSD, le réflecteur est utilisé en tant que filtre en énergie cinétique. Les fragments sont réfléchis sur les surfaces équipotentielles du réflecteur plus ou moins profondément, selon leur énergie cinétique. Les fragments les plus légers sont réfléchis plus rapidement et ont un temps de vol plus court.

Cependant, le réflecteur n'est capable d'analyser les ions fragments avec une résolution correcte que sur une certaine gamme d'énergie. Ainsi, un spectre complet d'ions fragments est acquis en plusieurs étapes durant lesquelles les potentiels appliqués dans le réflecteur sont progressivement

diminués. Finalement, toutes les acquisitions sont juxtaposées pour reconstituer le spectre d'ions fragments complet. Le spectre PSD est donc un spectre recomposé.

Par ailleurs, l'étalonnage des spectres PSD n'est pas aussi facile que celui des spectres MALDI-TOF classiques. Il n'y a pas de corrélation entre le temps de vol et la masse des ions fragments ; et de nombreux paramètres instrumentaux sont à prendre en considération.

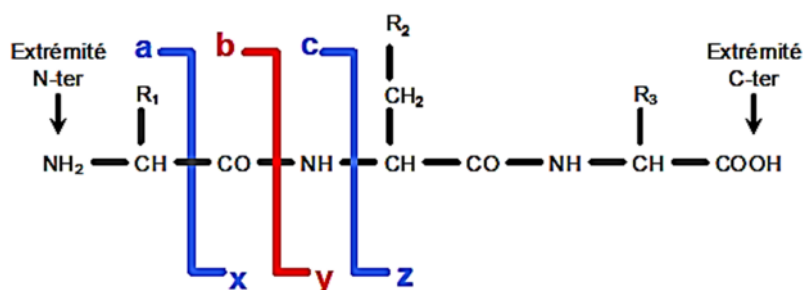
Par conséquent, malgré des progrès récents dans le domaine<sup>[252]</sup>, l'analyse PSD présente plusieurs inconvénients majeurs. Elle est longue et fastidieuse, peu sensible (au moins 10 picomoles d'échantillon sont nécessaires) et offre des résolutions très limitée (100 à 500 sur une gamme de 1000 m/z).

### 8.3 La fragmentation protéo-oligosaccharidique

Les expériences effectuées avec des trappes ioniques ou des Q-TOF permettent de générer des spectres de fragmentation de peptides qui permettent d'obtenir des informations sur la séquence en aminoacides et une grande spécificité dans l'identification des protéines en analyse protéomique.

#### 8.3.1 Nomenclature des fragments peptidiques

La nomenclature retenue actuellement pour les ions fragments fut proposée pour la première fois par Roepstorff<sup>[219]</sup> puis modifiée par Johnson et Biemann<sup>[220]</sup>. (Figure : 24)



ions de série **a**, **b** et **c** : charge positive portée par la partie N-terminal  
 ions de série **x**, **y** et **z** : charge positive portée par la partie C-terminal

**Figure 24:** Schéma des niveaux de fragmentations des peptides

Deux types d'ions sont observés par les fragmentations à basse énergie :

- Les ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie contenant l'acide aminé N-terminal. Il s'agit des ions des séries a, b, et c.
- Les ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie contenant l'acide aminé C-terminal. Il s'agit des ions des séries x, y et z.

Les différences de masse entre des ions consécutifs d'une même série permettent de déterminer l'identité des acides aminés consécutifs et donc de déduire la séquence du peptide à l'exception du couple d'acides aminés isobares Leucine/Isoleucine.

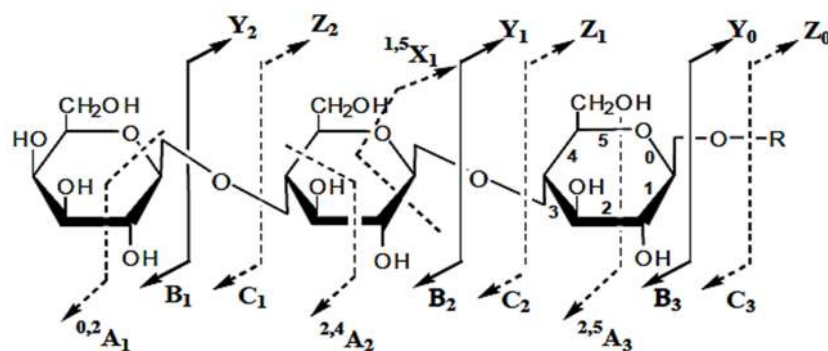
De la même manière Domon et Costello<sup>[221]</sup> ont établi une nomenclature pour la fragmentation des oligosaccharides (Figure 25) qui permet d'interpréter des spectres de fragmentation de glycane de glycopeptide. Suivant le même principe que pour les acides aminés. Ainsi, les différences de masse entre des ions consécutifs d'une même série permettent d'identifier les sucres d'un glycane (hexose, N-acetylhexosamine, deoxyhexose, etc).

### 8.3.2 La fragmentation des oligosaccharides

#### 8.3.2.1 Nomenclature de fragmentation des polysaccharides

Les fragmentations des polysaccharides par spectrométrie de masse se produisent au niveau des liaisons interglycosidiques (Bi, Ci, Yi, Zi) ou intracycliques (Ai et Xi). La nomenclature proposée par Domon et Costello<sup>[221]</sup> distingue (Figure : 25).

- Les fragments qui contiennent l'extrémité réductrice (Xi, Yi, Zi).
- Et ceux qui contiennent l'extrémité non-réductrice (Ai, Bi, Ci).



**Figure 25 :** Nomenclature de la fragmentation des polysaccharides.(Domon et Costello, 1988). Pour les fragments de type Ai et Xi, les numéros en exposants correspondent aux liaisons intracycliques cassées.

### 8.3.2.2 Les fragmentations des polysaccharides à haute et basse énergie

Les processus de fragmentation des polysaccharides sont différents selon qu'ils se produisent à haute ou à basse énergie :

A haute énergie, l'énergie délivrée aux ions précurseurs est suffisamment intense pour que tous les chemins de fragmentation soient empruntés sans aucune sélectivité.

A basse énergie (instruments triple quadripôle, trappe ionique) l'énergie d'activation est plus faible et arrive plus lentement aux ions précurseurs donc les fragments thermodynamiquement les plus stables sont générés.

Par conséquent, les ions fragments issus de la rupture des liaisons interglycosidiques (Bi, Ci, Yi, Zi) sont simultanément présents lors des MS à haute ou à basse énergie. Par contre, les ions issus des ruptures intracycliques (Ai, Xi) ne sont produits que lors des fragmentations à haute énergie. Ils restent minoritaires voire inexistant à basse énergie. Or, l'information structurale que renferment les ions fragments de type Ai et Xi est d'une grande importance puisqu'elle peut permettre de caractériser l'isomérisation de position des liaisons interglycosydiques.

Ainsi, la nature des informations obtenues est variable suivant le choix du spectromètre de masse. La caractérisation structurale des sucres peut se faire à des niveaux plus ou moins avancés. Nous pouvons donc avoir :

- La détermination de la séquence du polysaccharide
- Le motif de branchement.
- L'isomérisation de position des liaisons glycosydiques.

### 8.3.2.3 La détermination de la séquence et du motif de branchement des polysaccharides

Les fragmentations interglycosydiques (Bi, Ci, Yi, Zi) renseignent sur la séquence en oses et les branchements du polysaccharide. Toutefois, il peut être délicat de déterminer sans ambiguïté si les ions fragments contiennent ou non la partie réductrice du sucre. C'est notamment le cas pour les O-glycannes non dérivés qui présentent une symétrie. Pour les N-glycannes, la partie réductrice correspond à l'extrémité du core (N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine) ce qui facilite l'interprétation des spectres de fragmentation.

La définition du sens de lecture de la séquence des oses peut être favorisée par la dérivatisation chimique de la partie réductrice du polysaccharide. L'incrément de masse apportée par l'agent de dérivatisation permet de localiser l'extrémité réductrice. Les dérivatisations chimiques utilisées sont généralement des chromophores détectables par UV ou par fluorescence (également nécessaires

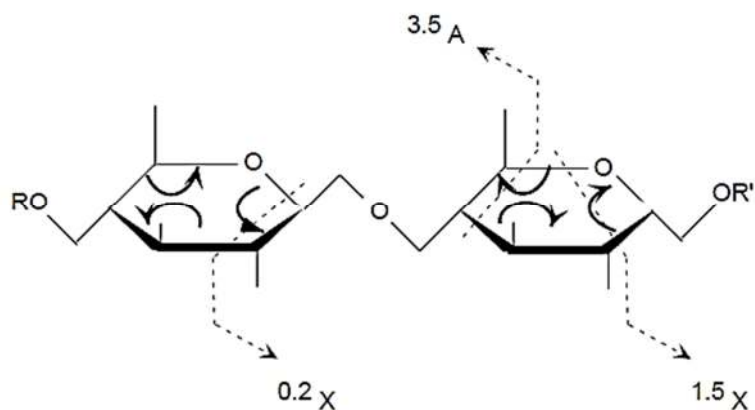


lors de l'étape de séparation et de purification des glycanes). Plusieurs travaux<sup>[222]</sup> ont conduit à l'optimisation des propriétés physico-chimiques de ces agents de dérivations. Ces composés sont sélectionnés pour leur grande affinité protonique. Ils favorisent la formation et l'ionisation d'ions fragments contenant la partie réductrice du sucre ( $Y_i$ ,  $Z_i$ ).

Par ailleurs, les polysaccharides peuvent être marqués sur leur partie réductrice par de l'oxygène isotopique  $O^{18}$ . Les fragments contenant la partie réductrice marquée sont ainsi identifiables grâce à leur profil isotopique<sup>[223]</sup>.

### 8.3.2.4 La détermination des isoméries de position

Les ions fragments de type  $A_i$  et  $X_i$  résultent de réarrangements intracycliques (Figure : 26) et peuvent dans certains cas déterminer la nature des isoméries de position. De nombreuses stratégies ont été développées pour favoriser ce type de clivage, telles que l'addition de métaux (lithium, cobalt) ou l'addition d'alcalino-terreux.



**Figure 26** : Réarrangements intracycliques à l'origine des ions  $A_i$  et  $X_i$ .

D'autre part, la perméthylation des polysaccharides renseigne sur les isoméries de position des liaisons interglycosidiques. Les fragments obtenus à partir de polysaccharides perméthylés sont différenciés suivant qu'ils sont issus d'un simple ou d'un double clivage, ce qui évite toute confusion lors de l'interprétation des fragments<sup>[223]</sup>.



## 8.4 Stratégies pour la caractérisation des protéines N-glycosylées par spectrométrie de masse

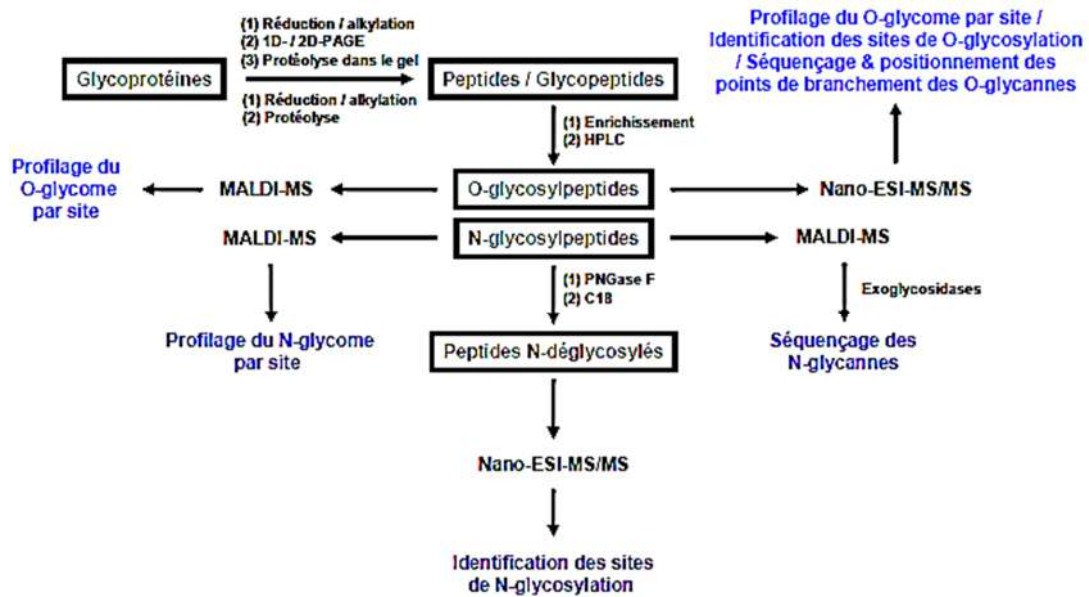
Pour caractériser une glycoprotéine, il est nécessaire d'identifier la séquence primaire de la protéine, de déterminer les sites de glycosylations et d'établir la structure des glycannes ainsi que leur hétérogénéité. Néanmoins ceci pose un certain nombre de difficultés car :

- Une glycoprotéine peut posséder plusieurs séquences consensus glycosylées ou non.
- Chaque site peut porter différents glycannes possédant des antennes de taille, de nature ou de nombre différent : c'est l'anténarité.
- Les glycosylations ne sont pas statiques ; elles varient de manière qualitative et quantitative en fonction de l'avancement d'un processus biologique.

La présence de plusieurs sites de glycosylation, la grande hétérogénéité de structure glycannique et le nombre élevé de stéréo-isomères rendent l'analyse des glycoprotéines plus complexe. C'est pourquoi, pour les études protéomiques, les glycoprotéines sont souvent déglycosylées avant leurs analyse<sup>[224][225]</sup> (Figure 27).

Les techniques les plus couramment utilisées pour l'analyse de glycoprotéines par spectrométrie de masse comportent plusieurs étapes qui peuvent être résumées par :

- Purification des glycoprotéines à partir de l'échantillon biologique (facultatif).
- Analyse des glycoprotéines entières par spectrométrie de masse afin d'obtenir des informations sur son hétérogénéité.
- Digestion des glycoprotéines par une endoprotéase afin d'obtenir un ensemble de peptides et de glycopeptides.
- Analyse des glycopeptides entiers (purifiés ou non) par spectrométrie de masse.
- Déglycosylation des glycopeptides afin d'obtenir un ensemble de peptides "nus" et de glycannes "libres" qui sont ensuite analysés par spectrométrie de masse.
- Identification de la protéine, détermination des sites de glycosylation et de la structure de glycannes.



**Figure 27** : Stratégie générale employée pour le profilage et la caractérisation structurale des N- et O-glycannes des glycoprotéines.

## 8.4.1 Analyse des glycoprotéines entières

### 8.4.1.1 Techniques de séparation et de concentration

Les glycoprotéines sont très hétérogènes et chaque glycoforme est généralement présente à de faible concentration dans un échantillon biologique. Il est donc souvent nécessaire d'utiliser une ou plusieurs étapes de fractionnement afin de faciliter leur caractérisation. La chromatographie d'affinité est une technique couramment utilisée qui permet de concentrer l'échantillon en glycoprotéines et ainsi de les analyser plus facilement. Une des phases stationnaires les plus communes est constituée par des lectines fixées sur de la sépharose ou de l'agarose. Les lectines sont des protéines qui interagissent de manière sélective avec un type de glycoforme sans le modifier.

Différentes lectines peuvent être utilisées pour isoler des glycoprotéines ayant des glycoformes différentes<sup>[226]</sup>. Il existe par exemple la ConA (concanavaleine A) qui est spécifique des glycannes contenant des mannoses ou des glucoses. La WGA (wheat germ agglutinin) qui reconnaît les N-acetylglucosamines et les acides sialiques. Une combinaison de différentes lectines permet de capturer plusieurs types de glycoformes.

#### **8.4.1.2 Analyse directe sur gel de polyacrylamide et membrane de PVDF**

La plupart des composés utilisés pour la purification des glycoprotéines n'interfèrent pas de façon significative avec les analyses. De même cette méthode permet l'analyse de très petites quantités de glycoprotéines. A partir de ses constatations, l'idée d'étudier des glycoprotéines directement après isolation par électrophorèse était intéressante à réaliser si la polyacrylamide n'interfère pas avec la détermination des monosaccharides. Le résultat a montré des pics correspondant au SDS.

Toutefois, ce problème peut être résolu en transférant les glycoprotéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF. Après un rinçage poussé de la membrane par l'eau, celle-ci est colorée au rouge ponceau, puis lavée à l'eau. Les bandes colorées sont alors découpées et rincées par du méthanol. Dans ces conditions, aucune interférence n'apparaît à condition que la membrane de PVDF fût correctement rincée par le méthanol. En effet, le matériel adsorbé sur les membranes de PVDF est beaucoup plus accessible au réactif de méthanolyse que sur les gels de polyacrylamide<sup>[227]</sup>.

#### **8.4.2 Analyse de glycoprotéines entières par spectrométrie de masse**

La caractérisation des glycoprotéines par spectrométrie de masse pose un certain nombre de difficultés qui sont liées à leur hétérogénéité. Comme il a été mentionné précédemment, une glycoprotéine est un mélange d'espèces moléculaires avec la même séquence en acides aminés mais des glycosylations différentes. Par conséquent, son étude par spectrométrie de masse aboutit à un spectre très hétérogène. De plus, l'intensité des ions est divisée par le nombre de glycoformes. Ces contraintes sont d'autant plus grandes que le nombre de glycoformes est important.

Contrairement aux méthodes séparatives pour déterminer le profil glycomique, les techniques spectrométriques sont capables à la fois de réaliser un profil N-/O-glycomique d'une glycoprotéine d'intérêt ou d'un mélange de glycoprotéines, elles permettent aussi de fournir avec une grande sensibilité et une meilleure résolution un certain nombre d'informations structurales. En effet, chaque glycanne qui résiste à l'ionisation est détecté sous la forme d'un ion pseudomoléculaire  $[M+nNa]_{n+}$ , en mode positif ( $n$  étant soit égal à 1, en ionisation MALDI, soit supérieur à 1, en ionisation ESI). Grâce à la précision en masse des instruments MALDI, la masse moléculaire et la composition en monosaccharides en termes de NeuAc, d'HexNAc, d'Hex et de d'Hexosamines, peuvent directement être attribuées à chaque glycanne. De plus, le couplage des oligosaccharides à une amine aromatique ou aliphatique par amination réductive, a pour effet d'accroître considérablement la sensibilité de détection de ces molécules par MS, ainsi par l'apport d'un site de protonation préférentiel, il facilite

l'ionisation des oligosaccharides, en mode positif. Comme les peptides, les oligosaccharides dérivés sont majoritairement détectés sous forme d'espèces moléculaires  $[M+nH]_{n+}$ , pouvant être accompagnées de signaux plus faibles  $[M+nNa]_{n+}$  ou  $[M+nH+mNa]_{(n+m)+}$ , en mode positif.

Le MALDI-TOF est le spectromètre de masse le plus répandu dans les laboratoires bioanalytiques. Cet instrument présente de nombreux avantages comme son potentiel à générer des ions moléculaires monochargés, sa grande sensibilité de détection, sa gamme de masse importante, son importante résolution, sa tolérance importante aux sels et à certains contaminants, et la possibilité de l'automatisation. Il est donc un outil glycobioanalytique incontournable des plateformes de glycomique et de glycoprotéomique à haut débit.

De plus, des études<sup>[337][338]</sup> ont démontrés le potentiel du MALDI-TOF de quantification très précise de chaque analyte glycanique, compte tenu de la linéarité qui existe entre l'intensité du signal de l'espèce pseudomoléculaire  $[M+Na]_{+}$  d'un N-glycane neutre et la quantité de matériel déposé sur la cible<sup>[228]</sup>.

L'acide dihydroxybenzoïque (DHB) est la matrice la plus communément utilisée dans l'analyse par MALDI-TOF-MS des glycanes. Les glycanes neutres produisent des signaux intenses  $[M+Na]_{+}$  accompagnés par des signaux plus faibles  $[M+K]_{+}$  en mode positif. Par ailleurs, l'analyse des structures sialylées par MALDI-TOF-MS, en mode réflectron et à extraction retardée présente un certain nombre d'inconvénients. Les glycanes sialylés sont détectés sous forme d'un mélange, parfois complexe, d'espèces pseudomoléculaires  $[M+Na]_{+}$ ,  $[M+K]_{+}$  et  $[M-nH+(n+1)Na]_{+}$ ,  $[M-nH+(n+1)K]_{+}$  en mode positif responsables d'une perte de sensibilité.

De plus, leur analyse conduit à d'importantes fragmentations en source (durant l'ionisation) et post-source (durant le vol), par perte des résidus de NeuAc, ce qui se traduit par l'apparition d'un grand nombre de signaux d'ions métastables qui compliquent les profils glycomiques de masse. Ces fragmentations peuvent être limitées en opérant les analyses en mode linéaire négatif mais avec une moins bonne résolution et/ou en présence d'une matrice douce telle que la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP)<sup>[229]</sup>.

Pour cela, un certain nombre de méthodes chimiques visant à augmenter la stabilité des résidus de NeuAc, lors d'analyses MALDI-TOF-MS en mode réflectron, ont été élaborées. La méthylestérification des fonctions carboxyles des résidus de NeuAc par réaction de leur sel de sodium avec l'iodure de méthyle permet l'analyse simultanée des structures sialylées et neutres en mode positif<sup>[230]</sup>.

La méthode de perméthylation développée par Ciucanu & Kerek<sup>[231]</sup> et modifiée par Ciucanu & Costello<sup>[232]</sup> permet également de stabiliser les résidus de NeuAc dans le but de rendre l'efficacité

d'ionisation des oligosaccharides sialylés équivalente à celle des oligosaccharides neutres et d'autoriser leur analyse simultanée en mode positif. Ainsi, sous forme perméthylée, les glycanes sialylés et neutres peuvent être quantifiés par MALDI TOF-MS. Enfin, l'efficacité d'ionisation des oligosaccharides perméthylés en MS est bien plus importante que celle des oligosaccharides natifs, ce qui a pour effet d'augmenter la sensibilité de détection de ces composés.

De plus, la séquence primaire et la configuration des carbones anomériques des résidus saccharidiques constituant les glycanes peut être confirmée par leur dégradation chimique et/ou exoglycosidasique séquentielle en solution, suivie de l'analyse par MALDI-TOF-MS des produits de digestions purifiés<sup>[233]</sup>. Par ailleurs, Les digestions peuvent être réalisées sur cible MALDI en utilisant des quantités picomolaires d'analytes glycaniques, suivies de l'analyse directe des produits de digestion cocrystallisés avec une matrice par MALDI-TOF-MS<sup>[234]</sup>.

Les glycoprotéines intactes peuvent être analysées par MALDI-TOF-MS. Il intéresse les glycopeptides de petite taille et comportant peu de glycoformes. Par contre, l'analyse des glycoprotéines très hétérogènes aboutit à un spectre complexe difficilement interprétable. Cependant, il est possible d'obtenir des résultats intéressants en optimisant le type de matrice et la préparation du dépôt MALDI<sup>[235]</sup>.

De manière générale, l'analyse des glycoprotéines intactes ne permet pas d'obtenir des informations significatives dès lors que la glycoprotéine comporte plus d'un site de glycosylation. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une approche qui passe par la digestion de la glycoprotéine à l'aide d'une endoprotéase de façon à générer de nombreux glycopeptides portant chacun un seul site de glycosylation afin de permettre la caractérisation de la micro-hétérogénéité.

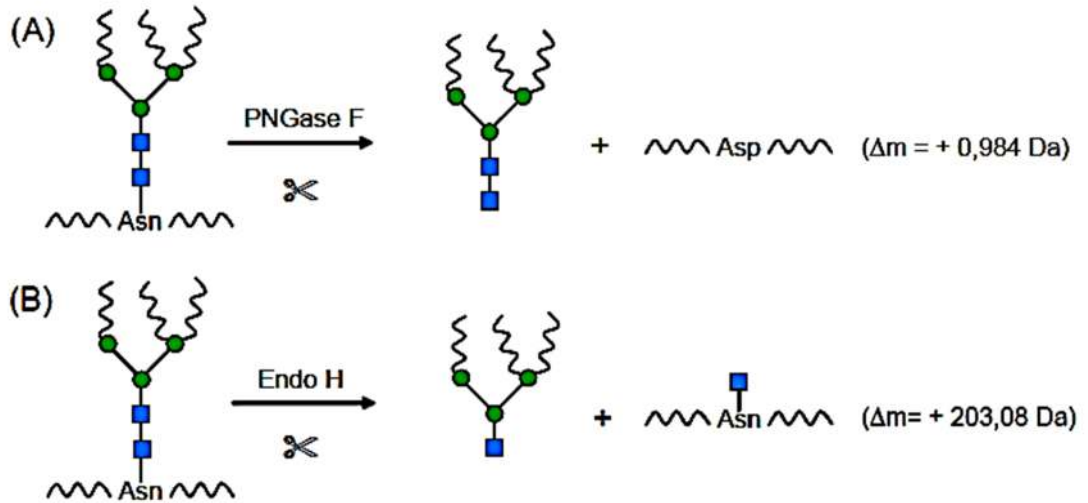
### **8.4.3 Analyse MS des N-glycanes des peptides déglycosylés.**

Cette stratégie de la déglycosylation nécessite plusieurs étapes qui comprennent la déglycosylation, le marquage des glycanes issus et l'analyse par spectrométrie de masse<sup>[224]</sup>.

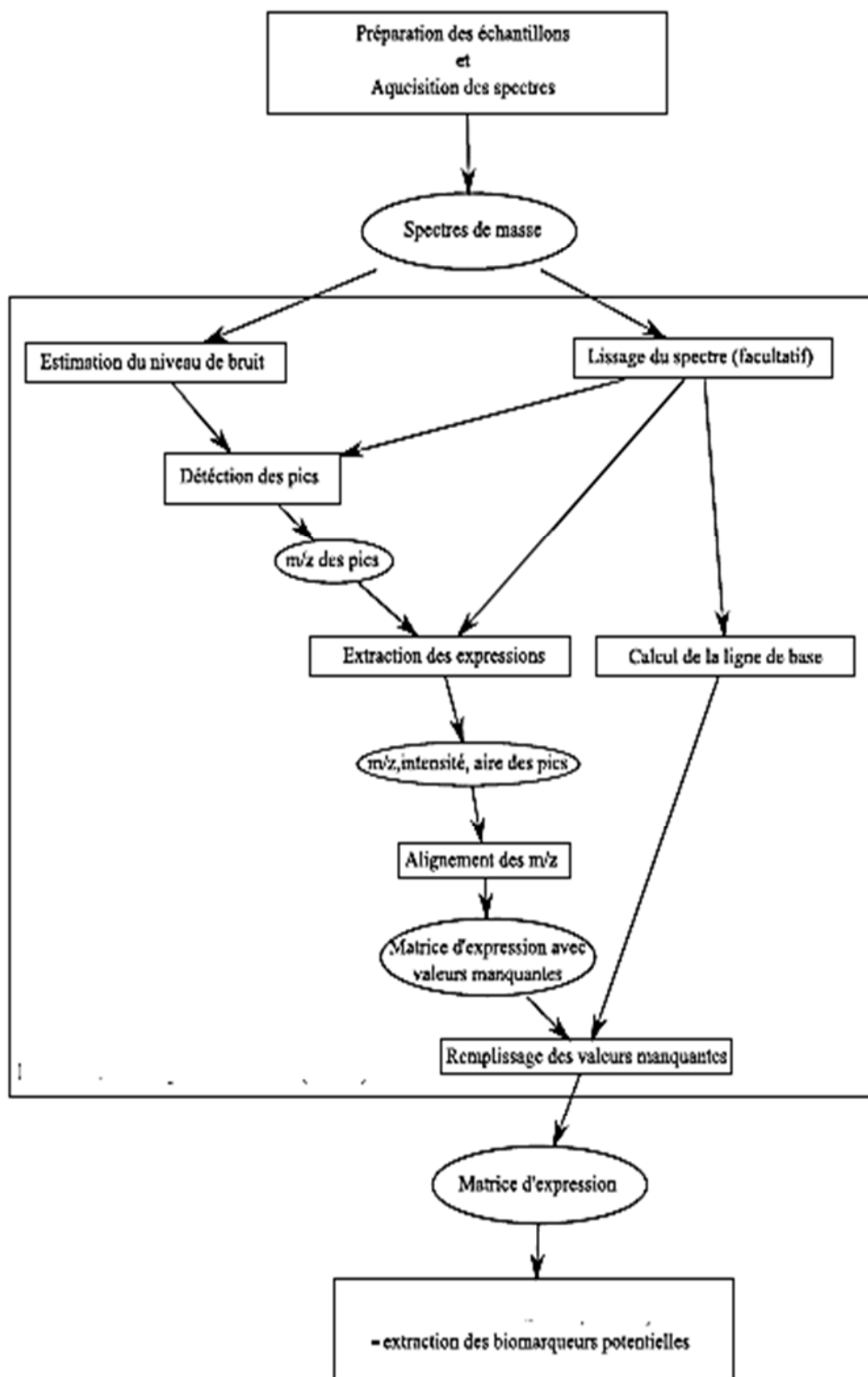
La libération du glycanne peut se faire chimiquement par  $\beta$ -élimination en milieu alcalin, hydrazinolise, acide trifluoro-methane sulfurique (TFMS)) ou avec une enzyme<sup>[236]</sup>. La méthode enzymatique conserve à la fois le glycanne et le peptide intact. En revanche, chaque enzyme est spécifique d'un type de glycosylation, il n'en existe pas d'enzyme universelle<sup>[237]</sup>.

La PNGase F (peptide N-glycosydase F) est l'enzyme la plus couramment utilisée. Elle coupe une grande variété de glycanes à l'exception de ceux qui portent un fucose en  $\alpha$ 1,3 sur le GlcNAc de l'extrémité réduite. Dans ce cas, il est possible d'utiliser la PNGase A. Ce type d'enzyme coupe la liaison entre le GlcNAc et l'asparagine. L'asparagine (Asn) glycosylée est alors déamidée pour

devenir un acide aspartique (Asp) (Figure : 28A). La différence de masse entre ces deux acides aminés est de 1 Da, ce qui permet d'identifier le site de glycosylation en effectuant une analyse MS du peptide déglycosylé.



**Figure 28:** Schéma des produits de digestion enzymatique des protéines et des peptides glycosylés. (A) la PNGase F et (B) l'Endo H.



**Figure 29:** Diagramme de la stratégie d'analyse des glycoprotéines entières.

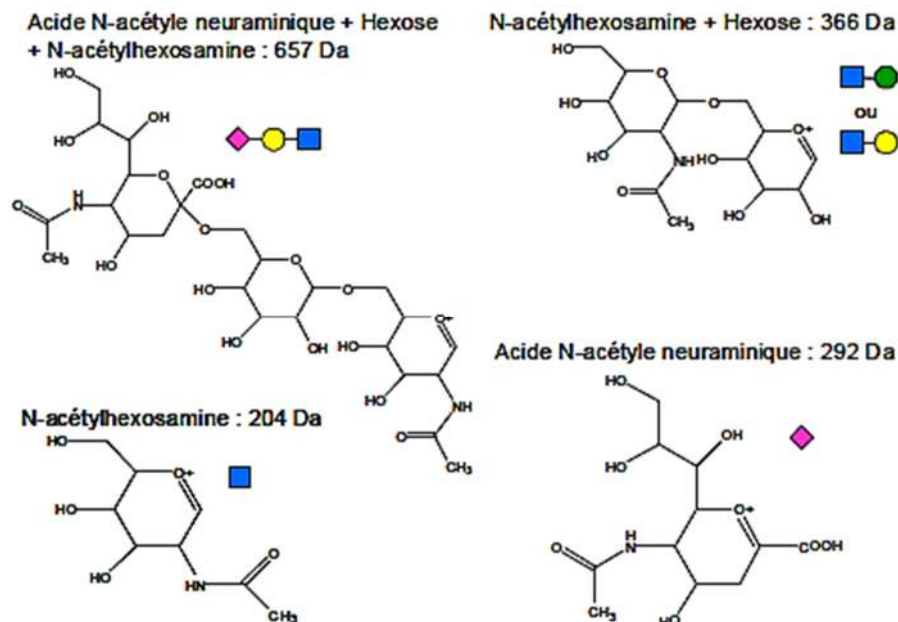
Il existe également des endoglycosidases qui coupent la liaison glycosydicque entre les deux résidus GlcNAc du tronc commun. La plus couramment utilisée est l'endoglycosidase H (endo H) qui libère les high-mannoses et une grande partie des glycanes de type hybrides. L'avantage de ce type d'enzyme est de laisser un résidu GlcNAc sur l'asparagine (Figure :28B). Le site de glycosylation est ainsi très clairement marqué.

Les glycanes libres peuvent ensuite être marqués au niveau de leur extrémité réduite avec un groupement chromophore, fluorophore ou une fonction ionisable afin d'améliorer leur détection<sup>[238]</sup>. Le marqueur le plus utilisé est la 2-amino-benzamide ou 2-AB<sup>[239]</sup>.

Une analyse par spectrométrie de masse permet alors d'obtenir une carte glycanique en caractérisant les glycanes et de séquencer les peptides déglycosylés pour trouver les sites de glycosylation<sup>[240]</sup>. Toutes ces étapes sont longues à réaliser et demande beaucoup de quantité de matériel d'extraction purifiés. De plus, l'information sur la micro-hétérogénéité est perdue (Figure :29).

#### 8.4.4 Détection des glycanes grâce aux ions diagnostiques

Les ions diagnostiques sont générés par fragmentation préférentielle des liaisons osidiques qui sont plus faibles que les liaisons peptidiques. Il s'agit d'ions oxoniums tels que m/z 204 (HexNAc<sup>+</sup>), 366 (HexHexNAc<sup>+</sup>), 163 (Hex<sup>+</sup>) ou 292 (Neu5Ac<sup>+</sup>) <sup>[241]</sup> (Figure :30).



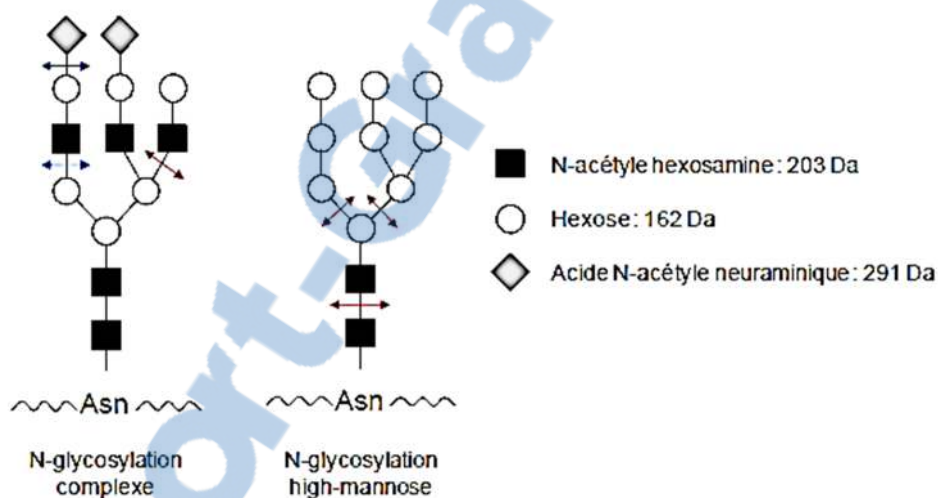
**Figure 30:** Structures chimiques des ions oxoniums servant d'ions diagnostiques.



Domon et Costello<sup>[221]</sup> ont établi une nomenclature pour la fragmentation des sucres dans la (Figure 30). Les ions diagnostiques sont de type B et Y et peuvent être générés de deux manières :

- Soit par fragmentation dans la cellule de collision<sup>[241]</sup> .
- Soit par fragmentation en source<sup>[242]</sup>.

Les ions diagnostiques sont issus de la fragmentation interne du glycanne et ont donc des masses moléculaires différentes en fonction du type de glycosylation. Pour les glycanes riches en mannoses par exemple on observe l'ion  $m/z$  366 (HexNAc<sup>+</sup>) dans des proportions moins importantes que pour les glycosylations complexes <sup>[243]</sup>. En effet, la génération de cet ion nécessite la coupure de 3 liaisons en cas de glycanne riche en mannoses et seulement d'une ou deux liaisons dans les cas des glycanes complexes (Figure : 31). De même, la présence ou non d'ions tels que l'ion  $m/z$  292 (Neu5Ac<sup>+</sup>) ou  $m/z$  657 (Neu5AcHexHexNAc<sup>+</sup>) indique si le glycanne porte ou non des acides sialiques<sup>[243]</sup> ( Figure 31).



**Figure 31** : Positions des liaisons à fragmentées pour la génération de l'ion  $m/z$  366

La littérature montre que les ions diagnostiques ont été peu utilisés dans la stratégie de caractérisation des glycoprotéines. Bien que de nombreux travaux décrivent l'utilité des ions diagnostiques, il existe peu de méthodes qui permettent de les générer à partir de mélanges complexes et en très petites quantités. Ces méthodes doivent encore être optimisées en termes de sensibilité, de précision de mesure de masse et de résolution.

### 8.4.5 L'analyse MS des glycopeptides

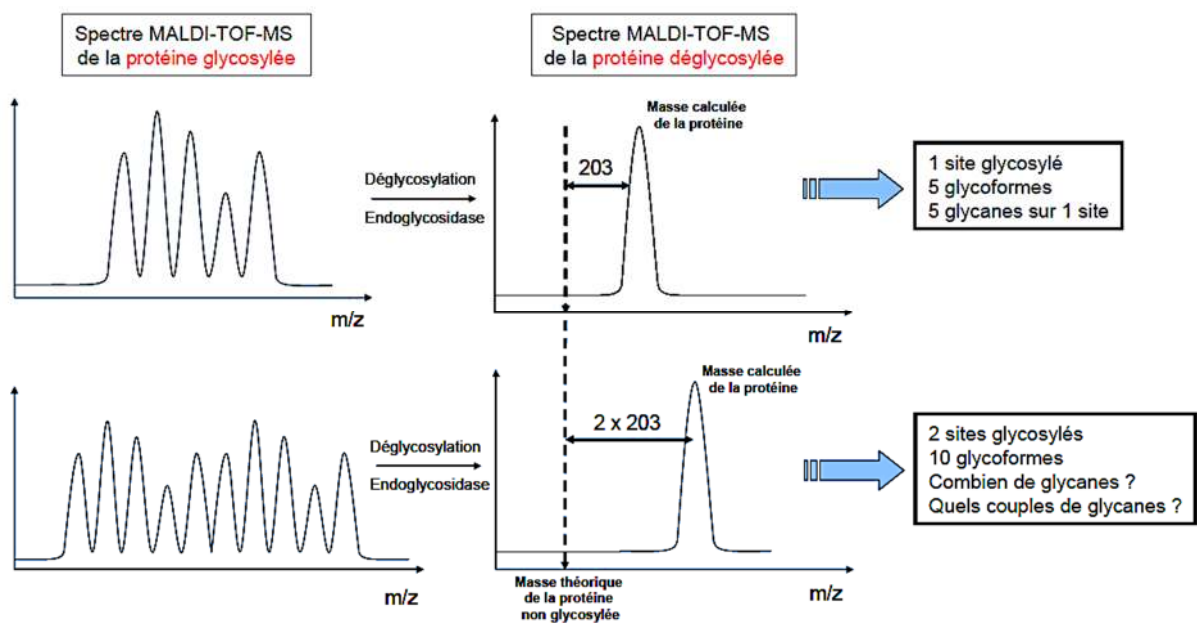
La fragmentation des N-glycopeptides permet de déterminer la composition de chaque glycanne sur chaque site de glycosylation mais également de déterminer le site de glycosylation. En effet, et de manière générale, les spectres de fragmentation CID des N-glycopeptides contiennent trois types d'ions fragments majoritaires :

- Les ions fragments correspondant à des pertes de sucres successifs sur la chaîne peptidique. Ces ions permettent de déterminer les enchaînements de monosaccharides et la composition de chaque glycanne.

- Les ions oxoniums dits "diagnostiques" de type Bi et Yi, issus de la fragmentation interne du glycanne. Ces ions donnent des informations supplémentaires sur la composition du glycanne mais permettent surtout d'identifier rapidement si un spectre MS correspond à la fragmentation d'un glycopeptide.

- Les ions correspondant au peptide non-glycosylé.

Dans certains cas, il est possible d'observer des ions correspondant à la fragmentation du peptide non glycosylé qui permet d'identifier la séquence en acides aminés du peptide (Figure :32).



**Figure 32 :** Schéma de la stratégie utilisé pour déterminer le nombre de sites glycosylés et éventuellement le nombre de glycoformes à partir d'un spectre MALDI-TOF-MS d'une glycoprotéine.

Néanmoins, la liaison glycosidique étant beaucoup plus labile que la liaison peptidique, les fragments les plus intenses correspondent à des pertes successives de sucres sur le glycopeptide et la présence d'ions fragments correspondant au peptide sont peu intenses voire inexistantes. Il est donc difficile de déterminer la séquence du peptide à partir du spectre MS.

Plusieurs articles sur l'analyse de glycopeptides par MS<sup>[244]</sup> montrent que la fragmentation CID a tendance à varier selon le type de spectromètre de masse, les paramètres instrumentaux, la séquence du glycopeptide, l'état de charge, etc. Sur les instruments de type Q-TOF par exemple les ions générés sont très dépendant de l'énergie de collision appliquée<sup>[245]</sup>. Ainsi la fragmentation d'un glycopeptide à basse et haute énergie est différente. A basse énergie, les ions observés correspondent majoritairement à la fragmentation du glycanne. A haute énergie, les ions générés correspondent à la fragmentation de la partie peptidique et permettent ainsi d'obtenir la séquence du peptide.

Il existe des logiciels d'identification et caractérisation des glycopeptides à partir d'analyses MS. Cependant, l'automatisation de l'interprétation de leurs spectres de fragmentation reste compliquée pour de multiples raisons. Tout d'abord il existe certaines banques de données pour les glycannes et non pas pour les glycopeptides. De plus il est difficile d'établir la séquence en acides aminés du glycopeptide étant donné que très peu de fragments correspondant au peptide sont observés dans les spectres,

C'est pourquoi, beaucoup de logiciels développés nécessitent de connaître la séquence de la glycoprotéine<sup>[246]</sup>. De plus et afin de limiter le taux de faux positifs, il est souvent recommandé d'utiliser un spectromètre de masse à très haute résolution, type FTICR<sup>[247]</sup>. Des problèmes se posent également en ce qui concerne la compatibilité avec les formats des listes de masses. Ainsi, certains logiciels ne sont utilisables qu'avec un certain type d'instruments. Enfin certains programmes semblent prometteurs mais ne sont pas utilisables sur des échantillons en quantité minimale<sup>[247]</sup>.

Le développement de la source ETD, méthode alternative appliquée à la caractérisation de N-glycopeptides par MS. Leur fragmentation par ETD étant non ergodique, elle permet de préserver les liaisons osidiques tandis que le squelette peptidique est fragmenté en générant principalement des ions C et Z. En combinant la fragmentation alternée ETD/CID, il est possible de remonter à la structure du glycanne et à la séquence du peptide, mais l'interprétation des spectres de fragmentation ETD reste très complexe et entièrement manuelle.

## 8.5 Séquençage et localisation des points de branchement des glycanes par MS

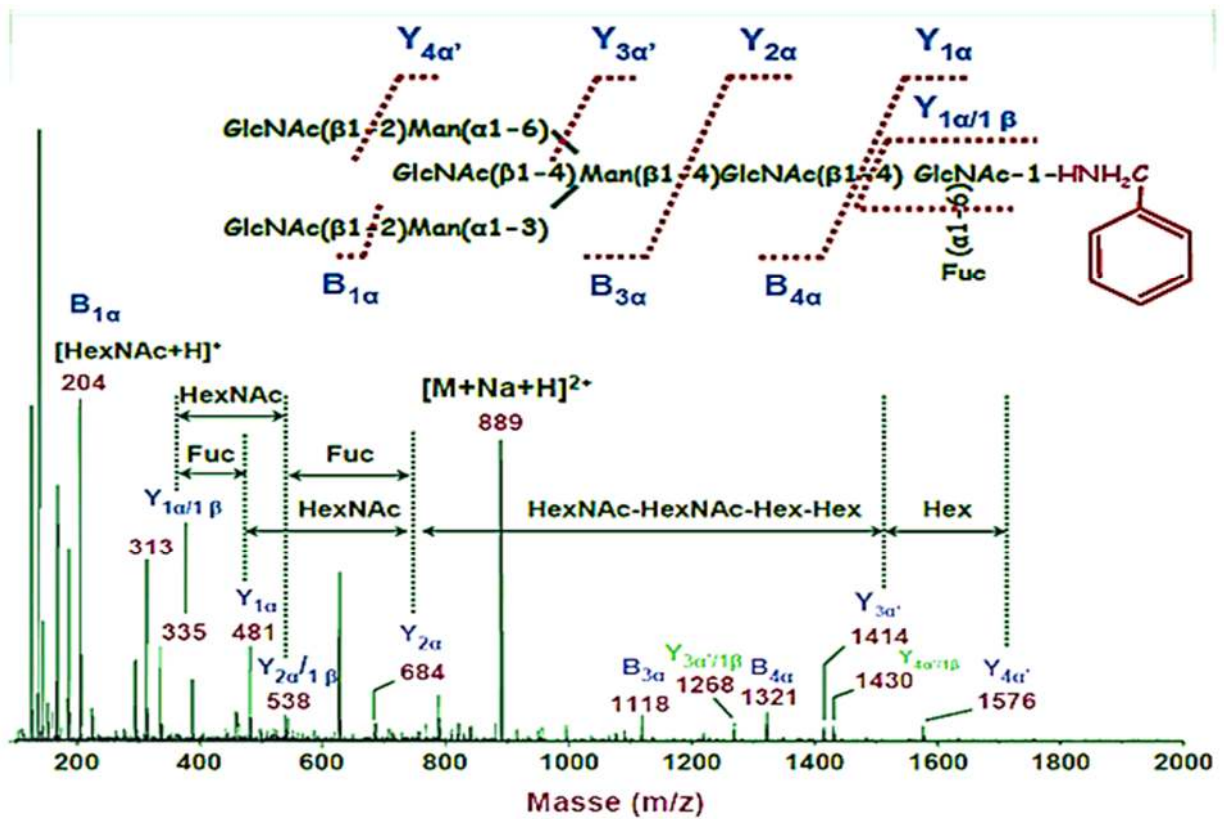
Le séquençage et la localisation des points de branchement des glycanes peuvent être déterminés par une simple analyse CID-MS/MS, comme par exemple en nano-ESI-Q/TOF-MS/MS, qui constitue une approche CID-MS/MS également très répandue dans les plateformes de protéomique et de glycomique, et qui permet l'obtention de spectres d'ions fragments de très bonne qualité<sup>[248]</sup>.

La fragmentation CID-MS/MS des glycanes se traduit par la présence d'ions fragments majoritairement de type B et de type Y issus de la rupture des liaisons glycosidiques. En fonction de l'énergie de collision utilisée et de l'état de charge de l'analyte glycanique, la nature et l'intensité du signal des ions fragments seront différentes. L'absence de certains fragments d'une série peut signifier la présence d'une ramification et permettre le positionnement d'un point de branchement, au sein de la séquence. De nombreux ions fragments diagnostiques, comme les ions oxonium (ions B), peuvent également être obtenus et permettent de déterminer la composition de certaines antennes.

Le séquençage des glycanes peut être réalisé par leur analyse soit sous leur forme native, soit sous leur forme dérivée (amination réductive/perméthylation)<sup>[249]</sup>. Comme dans le cas du séquençage nano-ESI-Q/TOF-MS/MS d'un N-glycane bi-antenné et fucosylé couplé à une amine aromatique, la benzylamine<sup>[250]</sup> (Figure: 33).

Le couplage augmente considérablement la sensibilité de détection et favorise la formation d'ions fragments Y grâce à la présence d'une charge au niveau de l'extrémité réductrice<sup>[244]</sup>. De plus, de nombreux fragments diagnostiques permettent notamment de localiser la fucosylation au niveau du résidu de GlcNAc proximal.

Par ailleurs, la séquence primaire et la configuration des carbones anomériques des résidus saccharidiques constituant les glycanes peut être confirmée par leur dégradation chimique et/ou exoglycosidases séquentielle en solution, suivie de l'analyse par MALDI TOF-MS des produits de digestions purifiés<sup>[251]</sup>. Les digestions peuvent par ailleurs être directement réalisées sur cible MALDI en utilisant des quantités pico molaires d'analytes glycaniques, suivies de l'analyse directe des produits de digestion cocrystallisés avec une matrice par MALDI-TOF-MS<sup>[252]</sup>.



**Figure 33** : Exemple de Spectre nano-ESI-Q/TOF-MS/MS de l'ion précurseur déchargé  $[M+Na+H]^{2+}$  à  $m/z$  889 correspondant au N-glycane dérivé de composition dHex1Hex3HexNAc5-Benzylamine, isolé de la LAMAN bovine.

# ***EXPOSE DES TRAVAUX REALISES***

# 1. Méthodologies et résultats

## 1.1 Etude des mucoprotéines

Les glycosaminoglycanes et leurs protéines conjuguées les mucoprotéines ou les protéoglycanes sont des constituants de la cellule, de la membrane cellulaire, du tissu conjonctif des membranes basales et des sécrétions muqueuses. Ce sont des glycoprotéines de nature. L'augmentation des niveaux des mucoprotéines ou des mucopolysaccharides a été observée dans diverses maladies aiguës ou chroniques ainsi que les maladies systémiques, par exemple les néoplasies, les maladies du collagène, la tuberculose et les infections.

La destruction tissulaire, l'inflammation et la prolifération cellulaire montrent une augmentation marquée de la concentration des glycoprotéines dans le sérum dans divers types de cancers. Il a été constaté que la mucine MUC1 forme un marqueur important de tumeur pour le cancer de testicule<sup>[253]</sup>. De plus l'augmentation des formes de l'acide sialique et de la sécrétion de diverses mucines ont été utilisés comme marqueurs potentiels chez les patients présentant un cancer de la région laryngée sous radiothérapie<sup>[234][255]</sup>, ainsi que certaines mucines exprimées dans des cellules épithéliales malignes du sein<sup>[256]</sup>.

### 1.1.1 Type de l'étude

C'est une étude descriptive prospective qui porte sur :

a) Population malade : 47 patients ayant un cancer

- Critères d'inclusion :

1) Patients adultes âgés de 48 ans à 73 ans

2) Les 2 sexes confondus

3) Patients hospitalisés dans le CHU Oran.

4) Diagnostic de cancer a été effectué par étude anatomopathologique de la biopsie de la lésion.

- Critères d'exclusion :

Les patients sous traitement ou venant de commencer un protocole de traitement oncologique.

b) Population témoin :

Agée de 38 à 52 ans. Il s'agit de sujets adultes sains, ne présentant aucune pathologie médico-chirurgicale apparenté. Les témoins ont été traités avec la même méthode de dosage que la population malade.

### 1.1.2 Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés classiquement sur des sujets à jeun ou ayant pris un repas léger. L'échantillon sanguin est obtenu par ponction veineuse franche, au niveau du pli du coude. Le sang a été recueilli sur trois tubes de prélèvement contenant des anticoagulants différents :

- EDTA à la concentration de 1 mg de sel disodique anhydre/ ml de sang. La quantité de sang recueillie est de 3 à 4ml.

- Le citrate de sodium à 3,2% dans un rapport de 9 volumes de sang pour un volume de citrate.

- L'héparinate de lithium à la concentration de 0,5 mg/ml de sang. La quantité de sang recueillie est de 4 à 5 ml.

Au total un volume de 12 à 13 ml était recueilli pour la réalisation de l'ensemble des dosages standard hématologiques et biochimiques.

Le prélèvement pour l'étude des mucoprotéines a été réparti dans 3 fractions aliquotes, après avoir effectué une double centrifugation des échantillons à 3000 tours/minutes pendant 15 à 20 minutes et séparé la phase plasmatique de la phase globulaire.

### **1.1.3 Méthodes de dosage des mucoprotéines**

Les mucoprotéines du sérum ont été mesurées par une méthode adaptée par Winzler<sup>[257]</sup> dans laquelle la valeur moyenne normale est indiquée par 8 mg/l.

- **Principe de la méthode :** On précipite les protéines par l'acide perchlorique puis les mucoprotéines dans le surnageant sont précipitées par l'acide phosphotungstique. La quantité de mucoprotéine précipitée ainsi a été quantifiée en déterminant sa teneur en tyrosine utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu<sup>[257]</sup>.

- **Technique de dosage :** 0.5 ml de sérum est ajouté à 4.5 ml d'une solution saline à 0.85%, puis 2.5ml de 1.8M d'acide perchlorique sont ajoutés au mélange goutte-à-goutte sous agitation douce. Après dix minutes le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre N 50 de Whatman, ensuite 1 ml de l'acide phosphotungstique à 5% est ajouté à 5 ml du filtrat.

Dans 3.5 ml on ajoute 0.5 ml du réactif Foline-Ciocalteu.

En même temps un étalon est préparé en prenant 0.5 ml de solution de tyrosine. La lecture pour les deux est réalisée à 680 nm par un spectrophotomètre SECOMAM Beckman contre un blanc. (Annexe : 3.1)

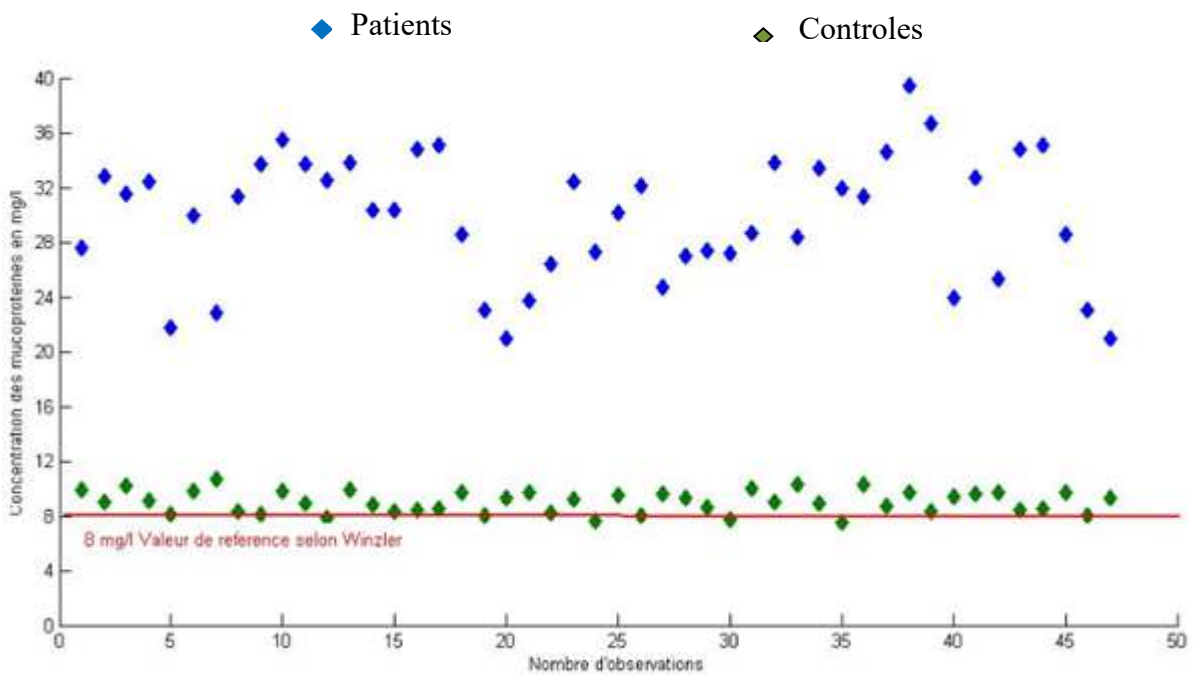
### **1.1.4 Résultats**

Les résultats des niveaux des mucoprotéines de sérum (en mg/l) chez les contrôles étaient ( $9.04 \pm 0.46$ ). Chez les patients ayant un cancer étaient de ( $30.15 \pm 4.62$ ) (Tableau : 11 et 12). La différence entre les deux s'avère significative, comme elle est évidente par rapport à la valeur seuil établie (Figure : 34). La différence entre les patients et la valeur de référence est également significative, alors que la différence entre les contrôles et la valeur de référence s'avère insignifiante. Ces résultats sont rapportés sur la représentation graphique fournie dans les (Figures : 35).



**Tableau 11 :** Statistiques descriptives des concentrations des mucoprotéines des patients et contrôles.

Récapitulatif des observations						
Etat	Sexe	N	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart type
Contrôles	Homme	22	9,12	8,48	10,22	0,43
	Femme	8	8,83	8,07	9,38	0,51
	Total	30	9,05	8,07	10,22	0,46
Etat	Sexe	N	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart type
Patients	Homme	30	29,67	18,00	39,44	4,46
	Femme	17	28,23	18,86	35,33	5,45
	Total	47	30,15	19,00	38,448	4,62



**Figure 34 :** Distributions des valeurs des mucoprotéines sériques des deux échantillons contrôle et pathologique.

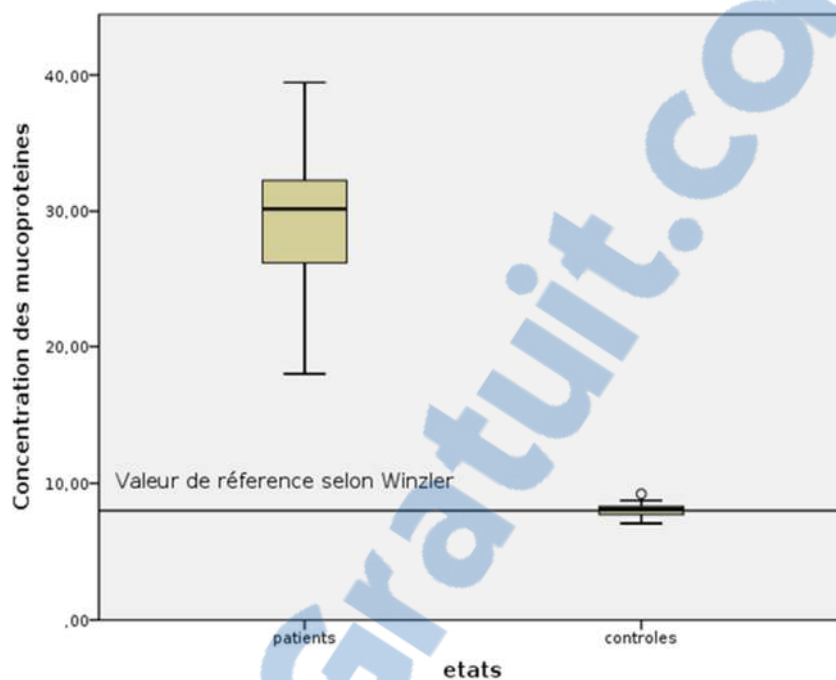
**Tableau 12 :** Valeurs des concentrations des mucoprotéines sériques chez les patients, les contrôles et de la valeur de référence.

Concentration des mucoprotéines du sérum (mg/l) Patients N = 47 Moyenne ± SD	Concentration des mucoprotéines du sérum (mg/l) Contrôle N = 30 Moyenne ± SD	Concentration des mucoprotéines du sérum (mg/l) Valeurs de référence Selon Winzler
Intervalle d'âge (année) 48 - 73	Intervalle d'âge (année) 38 - 52	-
30,15 ± 4,62	9,04 ± 0,46	8.0

**Tableau 13 :** Test statistique de comparaison des concentrations des mucoprotéines

Test des échantillons indépendants							
	Test t	Test t pour égalité des moyennes (p<0.005)					
		Différence erreur standard	Intervalle de confiance de la différence à 95 %		ddl	Signification (Bilatéral)	
			Inférieur	Supérieur			
<b>Mucoprotéines</b>	2,3700	8,48310	18,414683	21,794523	75	,000	<b>DS</b>

DS Différence significative.



**Figure 35** : Représentation graphique de comparaison des résultats des concentrations des mucoprotéines.

### 1.1.5 Discussion

Les mucoprotéines du sérum sont un type des glycoprotéines qui forme des constituants important de la membrane cellulaire et l'architecture de cellules. Ce sont également des constituants important des tissus conjonctifs et des membranes basales. Normalement, ils sont retrouvés dans le sang à de faibles concentrations<sup>[258]</sup>. Mais au cours des processus malins, la prolifération tissulaire, la dépolymérisation de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif dans l'environnement de la tumeur, augmente la production locale des mucoprotéines et favorise leur libération dans la circulation et par conséquent augmente la concentration des mucoprotéines dans le sérum<sup>[259]</sup>.

Par ailleurs, en plus de la prolifération des cellules, et la destruction de la membrane basale des cellules, le stress oxydative est également responsables de l'augmentation des mucoprotéines de sérum des patients souffrant de cancers<sup>[260][261]</sup>.

Pour analyser et expliquer les causes de cette augmentation. On a postulé que la croissance et la différenciation des cellules cancéreuses peuvent être impliquées dans la variabilité de l'expression de la synthèse des ARN messagers des mucines, en plus d'une corrélation positive qui a été décrite entre

la synthèse de mucine, la tumorigénicité, et le mauvais pronostic dans certains cancers colorectaux<sup>[262]</sup>.

Dans la présente étude l'augmentation des mucoprotéines de sérum chez les patients confirme l'observation de leurs augmentations dans divers cancers et renforce l'idée que le métabolisme des mucoprotéines est affecté excessivement dans plusieurs pathologies malignes. Ceci indique un changement inhérent des concentrations des mucoprotéines dans les tissus qui ont subi les transformations malignes.

Les niveaux élevés des mucoprotéines dans le sérum chez les patients présentant un processus malin ont montré une augmentation significative ( $P < 0.001$ ) en comparaison avec les valeurs des contrôles sains (Tableau : 13). L'élévation significative de niveaux des mucoprotéines peut être le produit de la carcinogenèse, la prolifération cellulaire, la dépolymérisation de la membrane basale autour de la tumeur, qui pourrait augmenter la production locale des mucoprotéines dans le sérum.

D'autres rapports<sup>[258]</sup> ont montrés qu'il existe entre les stades de la maladie une corrélation positive avec les taux sériques de mucoprotéines, ainsi des niveaux normaux des mucoprotéines du sérum après radiothérapie ont été corrélés avec la réponse clinique. Ceci s'explique par la diminution de la taille de la tumeur par la destruction des cellules tumorales et l'arrêt de la prolifération cellulaire qui pourrait être le résultat de la réduction des niveaux des mucoprotéines dans le sérum.

Par conséquent, comme la mesure des mucoprotéines dans le sérum est une méthode de laboratoire facile à réaliser en association avec d'autres investigations cliniques et biologiques, elle peut constituer une adjonction pour une évaluation des cas suspectés du cancer.

Seulement, cette mesure souffre d'une faible sensibilité et spécificité chez les patients présentant un cancer. L'idée était d'étudier plus en détail les glycoprotéines par l'identification et le dosage de composants plus spécifiques des glycoprotéines par rapport au mucoprotéines. Ainsi on a effectué le dosage du fucose qui est un sucre spécifique des glycoprotéines afin d'évaluer la variation des glycoprotéines chez les patients présentant la maladie cancéreuse.

## 1.2 Dosage du fucose

Les glycoconjugués exprimés à la surface des cellules sont importantes pour l'étude du développement et de la progression des cellules cancéreuses puisque plusieurs propriétés de ces molécules sont modifiées. Warren et al.<sup>[257]</sup> avaient constaté que seulement des traces des glycopeptides sialofucosyles caractéristiques des cellules tumorales sont retrouvées dans le sérum des sujets sains alors que de fortes concentrations sont retrouvées dans les cellules malignes des sujets présentant un cancer.

Les dosages des monosaccharides liés aux protéines ont été utilisés comme indicateurs sur les niveaux de glycoprotéines qui peuvent avoir une valeur diagnostique sur l'évolution de la maladie et l'apparition des métastases. Parmi ces derniers le L-fucose, qui est habituellement un sucre terminal. Il est l'un des sucres essentiels pour la transmission intercellulaire<sup>[263][264]</sup> normalement présent en faibles concentrations dans le sérum normal, alors qu'il est augmenté dans les cancers et d'autres maladies et peut être utilisé pour identifier les patients à haut risque pour la récurrence de la maladie tumorale et sa résistance à la thérapeutique.

L'augmentation du niveau de fucose dans le sérum chez les malades présentant une pathologie maligne est due à une élévation de certaines glycoprotéines particulières dans le sérum. Une mesure séparée du fucose permet l'évaluation de ces glycoprotéines et leur implication dans la pathologie cancéreuse.

### 1.2.1 type de l'étude

C'est une étude descriptive prospective qui porte sur des patients qui présentaient des cancers après diagnostic confirmé par étude anatomopathologique et avant tout traitement médical qui ont été hospitalisés dans différents services du CHU Oran.

a) La population d'étude est basée sur 41 cas de tumeur maligne :

- 14 cancers de l'estomac.
- 13 cancers de poumon.
- 4 cancers du sein.
- 2 cancers de la thyroïde.
- 4 leucémies.
- 1 cas de cancer du rectum
- 1 cas de cancer de l'œsophage.
- 1 cas de cancer du pancréas
- 1 cas de tumeur hépatique.

b) La population de contrôle est composée de 28 pathologies bénignes :

- 6 nodules du sein.
- 5 nodules de thyroïde.
- 3 tuberculoses du poumon.
- 5 adénomes prostatiques.
- 2 nodules de parotide.
- 1 cas de polype de rectum.
- 6 cas d'ulcère peptique.

Les renseignements cliniques, paracliniques et biologiques ainsi que la prise en charge et l'évolution étaient recueillis par un rapport médical rédigé par les médecins traitants pour chaque service du CHU Oran. Le diagnostic clinique a été établi par étude des pièces des prélèvements biopsiques pour les deux populations.

c) La population témoin normale :

Il s'agit de 37 sujets adultes âgés de 18 à 43 ans sains qui présentait des bilans normaux sans aucune particularité adressée au laboratoire de biochimie du CHU Oran pour des prélèvements pour un bilan pré-nuptial (c'est-à-dire des patients sans aucune pathologie médicale). Les bilans avec des valeurs biochimiques, hématologiques ou sérologiques anormaux ont été exclus de l'étude.

### **1.2.2 Prélèvements**

Les prélèvements ont été réalisés classiquement sur des sujets à jeun pour la population témoin normale. L'échantillon sanguin est obtenu par ponction veineuse franche au niveau du pli du coude. Le sang a été recueilli sur trois tubes de prélèvement contenant des anticoagulants différents pour la réalisation de l'ensemble des dosages hématologiques, biochimiques et sérologiques.

Le prélèvement pour le dosage du fucose est réparti dans 3 aliquotes, après avoir effectué une double centrifugation des échantillons à 3000 tours/minutes pendant 15 à 20 minutes et séparé la phase plasmatique de la phase globulaire.

### **1.2.3 Méthode de dosage du fucose**

- **Principe de la méthode :** Cette méthode repose sur le dosage du fucose lié aux protéines décrite par Dische et Shettles<sup>[265]</sup> en utilisant la méthode proposée et modifiée par Winzler qui se résume par la détermination de méthylpentose produit de la transformation du fucose dans la solution.

- **Technique de dosage :** Le dosage du méthylpentose est déterminé par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 396 nanomètre et 430 nanomètre par un spectrophotomètre SECOMAM Beckman. Une solution standard de L fucose de Sigma Aldreich a été utilisée.

La concentration du fucose de la fraction insoluble est réalisée par simple calcul de la soustraction de la concentration du fucose de la fraction soluble de celle du fucose total. (Annexe :3-2)

#### **1.2.4 Resultats**

Le (Tableau : 14) montres la teneur en fucose des fractions insoluble et soluble dans les sérums des sujets de la population saine et des patients présentant les maladies bénignes ou malignes. Comme il est indiqué dans les figures, la fraction soluble représentait 45% du fucose total sérique dans la population saine (moyenne,  $3.14 \pm 0.14$  mg/100 ml). Elle est légèrement élevée dans les sérums des patients présentant des pathologies bénignes et malignes (moyennes,  $4.70 \pm 0.21$  et  $4.24 \pm 0.25$  mg/100ml, respectivement). Cependant, la différence entre la population des patients présentant une tumeur maligne et la population avec des pathologies bénignes est non significative. D'autre part, la teneur du fucose dans la fraction insoluble des sérums des patients avec des tumeurs malignes est élevé de l'ordre de ( $9.00 \pm 0.51$  mg/100ml). Aucune différence significative n'a été retrouvée dans les sérums des sujets normaux ou les patients présentant des maladies bénignes (valeur moyenne  $3.73 \pm 0.19$  et  $3.18 \pm 0.25$  mg/100 ml, respectivement).

Les observations ci-dessus sont représentées par les Figures 36, 37 et 38 montrent que les niveaux élevés du fucose dans le sérum des patients avec des tumeurs malignes enregistrés sont liés principalement à une augmentation du fucose dans la fraction insoluble.

Ce résultat est démontré par les Figures 39 et 40, où la concentration de fucose total est portée sur les ordonnées et la quantité de fucose dans la fraction insoluble et soluble respectivement est portée sur les abscisses. Le niveau du fucose dans la fraction insoluble est une fonction linéaire, tandis qu'aucune relation linéaire entre le fucose total et sa teneur dans la fraction soluble n'a été retrouvée dans les sérums de la population témoin normale et les patients présentant les maladies bénignes ou malignes.

**Tableau 14** : Récapitulatif des valeurs du fucose enregistrés.

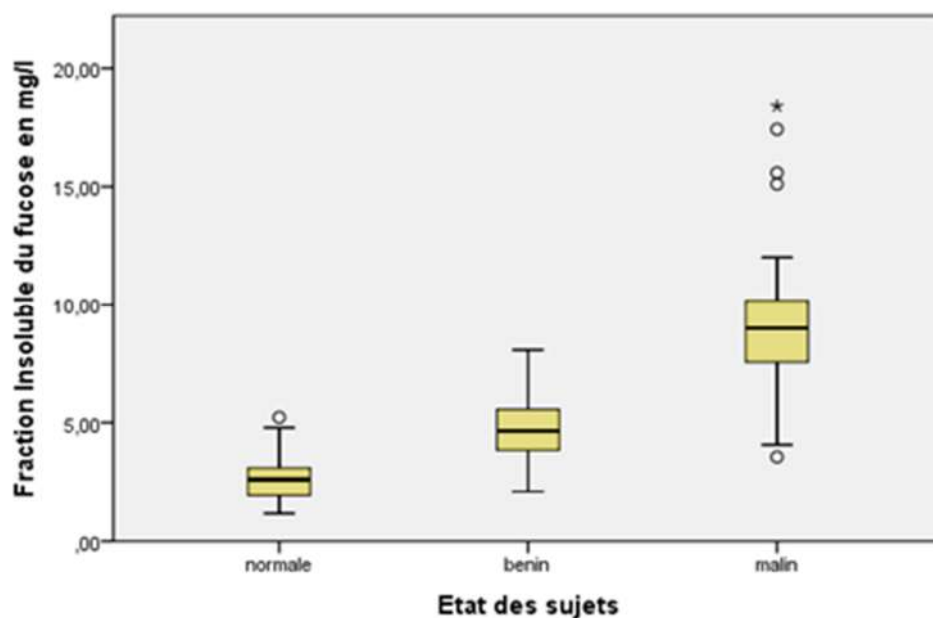
<b>Récapitulatif des observations</b>					
<b>Etats</b>	<b>sexe</b>		<b>Fucose Fraction Insoluble</b>	<b>Fucose Fraction Soluble</b>	<b>Fucose Total</b>
<b>normale</b>	<b>homme</b>	N	24	24	24
		Moyenne	2,5753	2,8392	4,5577
		Écart-type	0,91626	1,24391	1,47779
		Minimum	1,22	0,87	2,39
		Maximum	4,79	5,93	8,34
	<b>femme</b>	N	13	13	13
		Moyenne	2,7028	2,7030	4,6667
		Écart-type	1,03838	1,58058	1,28634
		Minimum	1,17	0,86	2,38
		Maximum	5,2 2	5,90	6,60
<b>bénin</b>	<b>homme</b>	N	15	15	15
		Moyenne	4,5035	3,4305	8,5816
		Écart-type	1,42718	1,31379	2,60281
		Minimum	2,09	1,76	4,40
		Maximum	8,08	6,18	12,47
	<b>femme</b>	N	10	10	10
		Moyenne	4,9676	4,0012	6,7121
		Écart-type	1,10083	1,37974	2,09940
		Minimum	3,14	1,39	3,35
		Maximum	7,09	6,30	11,23
<b>malin</b>	<b>homme</b>	N	18	18	18
		Moyenne	8,3370	5,8408	12,0364
		Écart-type	2,77626	2,09015	3,08627
		Minimum	3,55	2,45	5,83
		Maximum	15,11	9,96	16,49
	<b>femme</b>	N	23	23	23
		Moyenne	9,8687	5,0641	12,8861
		Écart-type	3,39161	1,84350	3,93062
		Minimum	4,07	1,93	7,29
		Maximum	18,40	8,61	22,38



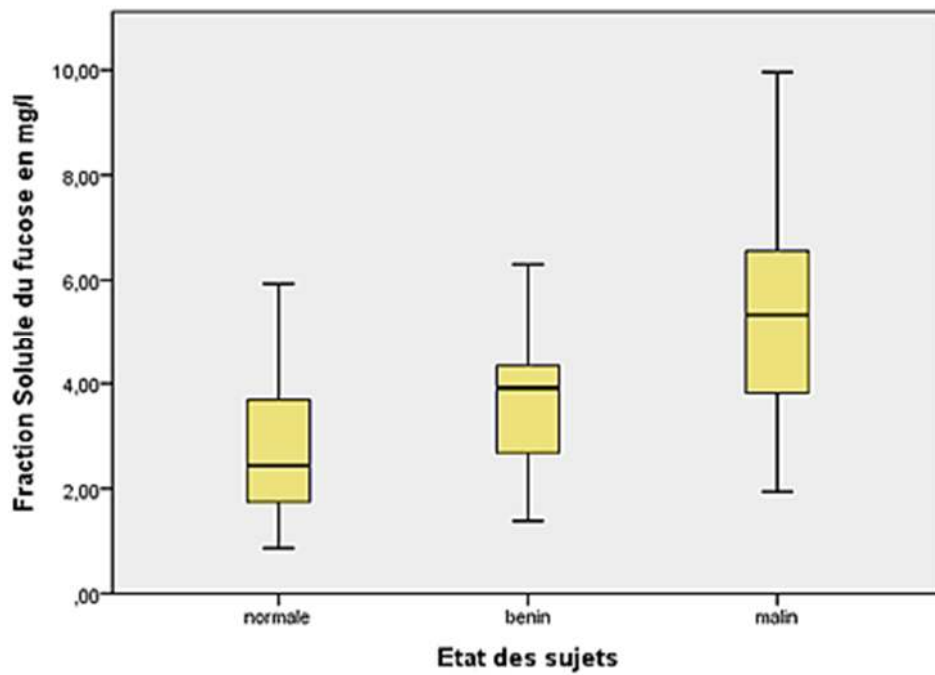
**Tableau 15 :** Tests statistiques de comparaison de la concentration du fucose entre les différents échantillons des populations d'étude

Test des échantillons indépendants					
Normal/bénin	t	Test t pour égalité des moyennes (P<0.005)			
		ddl	Signification (bilatéral)	Différence erreur standard	
Concentration du fucose total	-6,347	63	,000	<b>DS</b>	,49119
Normal/Malin	t	ddl	Signification (bilatéral)	Différence erreur standard	
Concentration du fucose total	-12,646	76	,000	<b>DS</b>	,62603
Bénin/Malin	t	ddl	Signification (bilatéral)	Différence erreur standard	
Concentration du fucose total	-6,140	67	,000	<b>DS</b>	,78172

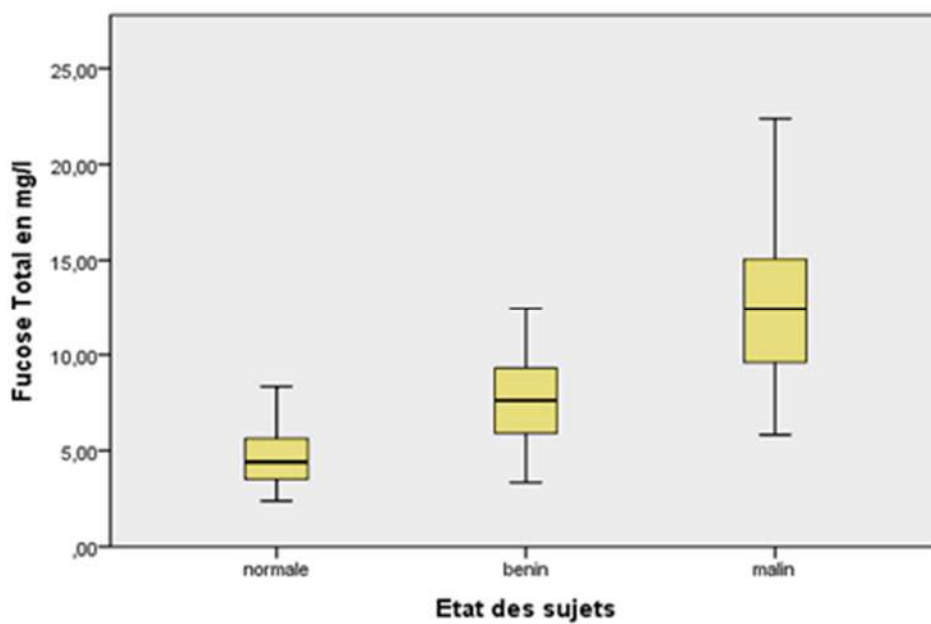
DS Différence significative, NS Différence non significative.



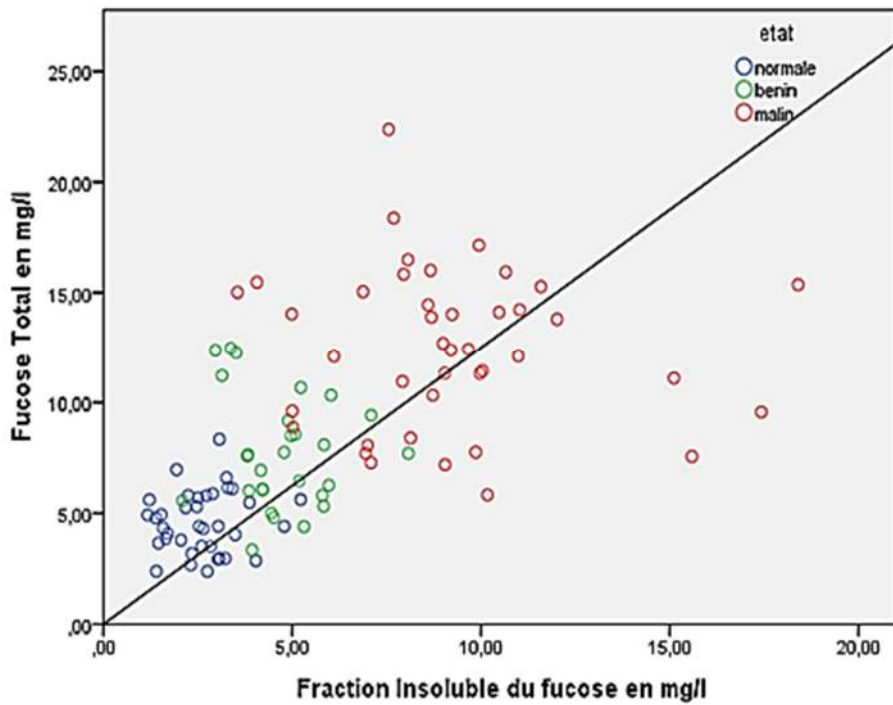
**Figure 36 :** Valeurs des concentrations du fucose de la fraction insoluble.



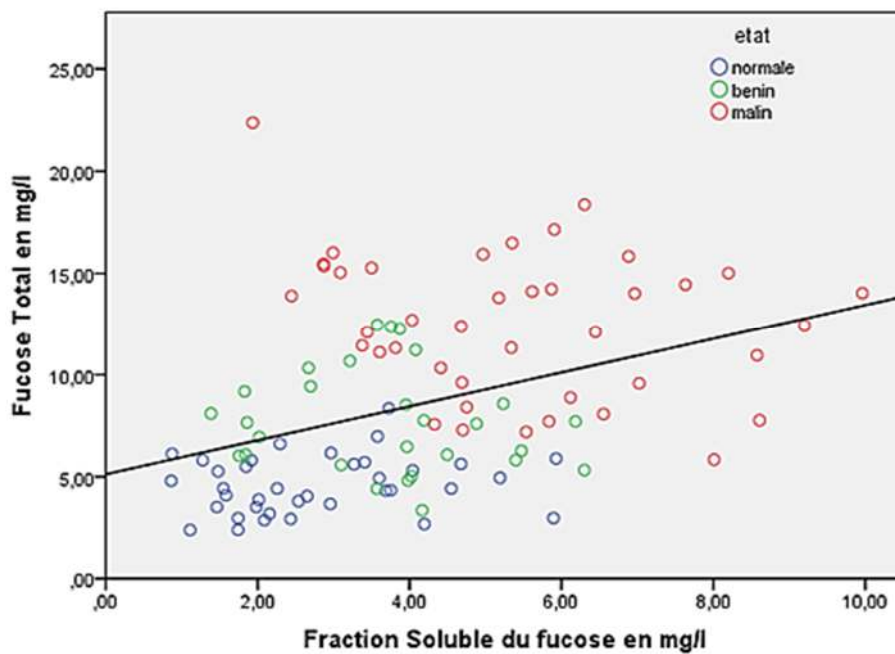
**Figure 37** : Valeurs des concentrations du fucose de la fraction soluble.



**Figure 38** : Valeurs des concentrations du fucose total.



**Figure 39 :** Courbe de corrélation des concentrations du fucose de la fraction insoluble et du fucose total.



**Figure 40:** Courbe de corrélation des concentrations du fucose de la fraction soluble et du fucose total.

### 1.2.5 Discussion

Des études indiquent que les glycoprotéines sont souvent augmentées au-dessus des niveaux normaux dans les sérums des malades avec un cancer aussi bien que dans les sérums des animaux de laboratoire portant des tumeurs expérimentales<sup>[266][267]</sup>.

La mesure des monosaccharides liés aux protéines des glycoprotéines a été utilisée comme indicateurs sur les niveaux des glycoprotéines. Un monosaccharide le L-fucose ; pentose méthylé est un sucre terminal dans la plupart des glycoprotéines de plasma est présent dans beaucoup de glycolipides et de glycoprotéines y compris plusieurs familles des antigènes des groupes sanguins<sup>[268]</sup>. Des variations ont été observées dans le degré de fucosylation de ces molécules dans les tissus des malades avec un cancer dus à l'activité de fucosyltransférase et particulièrement dans le sérum des patients souffrant de pathologies malignes avec des métastases<sup>[269]</sup>.

Dans le sérum sanguin existent différents types de glycoprotéines. Les mucoprotéines du sérum qui sont composé principalement de l'acide  $\alpha$ -globuline (orosomucoïde) et l'haptoglobine qui contiennent un grand nombre d'ose, alors que les glycoprotéines qui contiennent une faible proportion des oses comprennent l' $\alpha$ 1- et l' $\alpha$ 2-globuline, la transferrine et le fibrinogène<sup>[269]</sup>. Les deux types ont été utilisés comme indicateur des variations de la concentration des glycoprotéines dans des séries de maladies y compris le cancer. Bien qu'il existe une discordance dans l'augmentation des glycoprotéines dans les pathologies cancéreuses courante<sup>[270]</sup>. Cependant, on pense que cette augmentation est due à une surexpression soit de la plupart des glycoprotéines et mucoprotéines ou seulement dans un certain nombre défini de glycoprotéines. Puisque les hexoses et les hexosamines sont des composés principaux et communs des glycoprotéines et des mucoprotéines alors que le fucose est un composant moins fréquent et plus spécifique pour les glycoprotéines, ainsi l'augmentation des glycoprotéines par l'expression de la teneur des hexoses et hexosamines peut toujours ne pas être parallèle à l'augmentation de la teneur de fucose dans le sérum. Cette observation a été notés dans un rapport indiquant que la teneur en mucoprotéines dans le sérum correspond à la fraction soluble dans l'acide perchlorique qui contiennent environ 10% du fucose totale liés aux protéines dans le sérum<sup>[257]</sup>.

Dans notre étude, cependant, on observe que la fraction soluble contient approximativement 45% de fucose total du sérum. Winzler et Burk<sup>[271]</sup> ont indiqués que le plasma des malades avec cancer contient un niveau des mucoprotéines sensiblement plus élevé que celui d'une population normale. Cette constatation a été davantage confirmée dans d'autres études<sup>[272]</sup>. Nos résultats montrent cependant, que les niveaux du fucose total dans la fraction soluble chez les sujets contrôles avec une pathologie bénigne et chez les patients avec des pathologies tumorales étaient augmentés. Ces résultats sont probablement dus au fait que la teneur de fucose total a été estimé par la fraction

soluble c.-à-d., les sérums des malades avec un cancer contiennent probablement un niveau plus élevé des glycoprotéines contenant du fucose que des mucoprotéines contenant des hexoses et des hexosamines.

Nos résultats indiquent clairement que la teneur de fucose dans la fraction insoluble du sérum a augmenté de manière significative chez les malades avec un cancer (Tableau :15). Puisque le contenu de fucose dans la fraction insoluble suit une courbe linéaire avec le fucose total, il est raisonnable d'attribuer le niveau élevé du fucose total dans le sérum des malades avec un cancer à l'augmentation de fucose lié aux glycoprotéines. Comme il a été décrit dans une étude [273] que le niveau élevé du fucose total chez les patients avec une tuberculose ou un processus inflammatoire, peut également être attribué à l'augmentation de fucose dans la fraction insoluble. En conclusion on pense que le contenu de fucose dans la fraction insoluble représente la teneur des concentrations des glycoprotéines et il est plus utile dans le dépistage d'un processus malin que le fucose total.

### **1.3 Dosage de l'acide sialique**

L'acide sialique (SA), dérivé acétylé de l'acide neuraminique, est largement retrouvé dans les tissus des mammifères ainsi que chez les bactéries et les virus [274]. Il est habituellement lié aux glycoprotéines, aux glycolipides, aux oligosaccharides et aux polysaccharides. Une petite quantité est libérée dans le sang. L'acide sialique est un composant structural important des membranes biologiques. C'est un composant soluble des glycoconjugués de surface des cellules animales et des tissus, il semble être impliqué dans la régulation des phénomènes de communication intercellulaire ainsi que dans la transformation maligne [275].

La concentration de l'acide sialique augmente rapidement suite à un processus inflammatoire ou à un traumatisme [276]. Le mécanisme induisant son augmentation n'est pas clairement établi. Cependant, on a remarqué que l'acide sialique localisé à l'extrémité de plusieurs protéines de la phase aigüe de l'inflammation peut être utilisé comme marqueur pour les processus inflammatoires puisque les protéines de l'inflammation dans le sérum, tel que l' $\alpha$ 1-glycoprotéine est une glycoprotéine sialylée.

La majorité des patients qui présentent des tumeurs malignes montrent une concentration élevée du taux d'acide sialique dans leurs sérums. Des niveaux augmentés ont été enregistrés également chez les patients présentant une leucémie [277], un mélanome malin [278], aussi bien que dans le cas du cancer endométrial, du cancer du sein [279], du poumon [280], de la prostate [281], de la vessie [282], du côlon [283] et de l'ovaire [284].

#### **1.3.1 Type de l'étude**

C'est une étude descriptive prospective réalisée au CHU d'Oran.

1) La population des sujets ayant un cancer sans métastase composé de :

- 30 malades ayant un cancer colorectal avant toute intervention chirurgicale, d'un âge moyen de  $55.95 \pm 4.9$  intervalle (49-71 ans).

2) La population de sujets ayant un cancer avec métastase :

- 24 patients (14 hommes et 10 femmes) ont été inclus dans l'étude. L'âge moyen était de  $58.8 \pm 9.2$  ans (intervalle 29-70 ans). 18 patients avaient été traités pour un cancer du côlon et 6 pour un cancer du rectum. Tous les patients ont subi une chirurgie pour leur tumeur primaire et ont développé des métastases visualisées par tomодensitométrie ou échographie :

- 8 patients ont présenté des métastases osseuses.
- 4 patients des métastases hépatiques.
- 6 patients des métastases pulmonaires.
- 4 patients des métastases hépatiques et pulmonaires.
- 2 patients une péritonite carcinomateuse, avec ou sans métastases hépatiques.

Les patients qui ont subi une chimiothérapie antérieure, ou âgés de plus de 70 ans ont été exclus de l'étude.

### 3) Population contrôle :

Il s'agit de 32 sujets adultes apparemment en bonne santé (16 hommes et 16 femmes) âge moyen  $40.9 \pm 4.9$  ans (intervalle 29-51).

### 1.3.2 Méthode de dosage

- **Principe de la méthode** : Principe : le dosage des acides sialiques total (TSA) par la méthode de Warren s'effectue en deux étapes :

1) libération des acides sialiques : soit par hydrolyse acide douce, en raison de la fragilité des liaisons cétyl des acides sialiques et de ces composés eux-mêmes, soit par hydrolyse enzymatique réalisée avec des neuraminidases,

2) formation d'un chromogène : l'acide formylpyruvique par oxydation périodique donne un chromophore de coloration rose (lue à 550 nm) par condensation avec l'acide 2-thiobarbiturique<sup>[339]</sup>.

- **Technique de dosage** : Pour dosé l'acide sialique total (TSA) 10 mg de protéine après traitement par chloroforme/méthanol (2/1v/v) sont hydrolysés dans 2 ml d'acide sulfurique 0,1 N pendant 1 h à 80 °C. Après oxydation périodique et coloration à l'acide thiobarbiturique le dérivé colore est extrait par la cyclohexanone. L'absorbance est mesurée à 550 nm par un spectrophotomètre UVIKON 2000.

Concernant l'acide sialique libre (FSA) on procède avec la même méthode de Warren sans l'étape d'hydrolyse des liaisons des acides sialiques aux protéines par incubation de la solution pendant 1h à 80 °C. Enfin pour le dosage de l'acide sialique lié (BSA) on fait la soustraction de FSA de TSA.

Les concentrations d'acide N-acétylneuraminique de 0.4 et 4 mmol/L sont utilisés pour tracer la courbe d'étalonnage (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Des mesures de l'acide sialique en réplique sont réalisées pour chaque échantillon. La teneur en protéines est estimée par la méthode de Biuret<sup>[286]</sup>. De l'albumine de sérum de bœuf a été utilisée comme standard. (Annexe : 3-3)

### 1.3.3 Résultats

Une concentration en sérum du TSA supérieure à 2.33 mmol/L a été considérée comme anormale<sup>[287]</sup>. La sensibilité de TSA a été évaluée par le pourcentage des patients ayant un carcinome colorectal métastatique avec des valeurs de TSA au-dessus du niveau du seuil défini. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les niveaux de TSA chez les patients avec et sans métastases.

Les taux d'acide sialiques dans le sérum ont été évalués chez 30 patients ayant un adénocarcinome colorectal et comparés à ceux de 32 sujets sains (Tableau : 16 et 17).

A partir de ces données, il est évident que la concentration moyenne d'acide sialique total sérique (TSA) est sensiblement plus élevée chez les patients avec un cancer colorectal que chez les sujets témoins. La valeur du TSA chez ces patients montre une augmentation de 71% alors qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux sexes.

Approximativement 99% de l'acide sialique total retrouvé dans le sérum des patients ayant un adénocarcinome colorectal et des sujets normaux est lié aux protéines (BSA). La teneur du BSA dans le sérum a été également retrouvée augmentée chez 71% des patients avec un cancer colorectal, en comparaison avec les sujets normaux, alors qu'aucune variation importante de la concentration de l'acide sialique libre (FSA) n'a été constatée entre les deux groupes.

Le FSA représente seulement 1% de la teneur de TSA. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pris en considération ce paramètre dans notre étude.

La concentration des protéines totales sériques (TP) a été déterminée et une diminution significative ( $P < 0.001$ ) était observée chez les patients ( $72.39 \pm 9.03$  mg/ml) comparée au niveau des protéines totales sériques du groupe témoin ( $90.62 \pm 10.78$  mg/ml). Par conséquent, suivant les indications du (Tableau 18), quand les paramètres TSA/TP et BSA/TP ont été comparés entre les deux groupes, une augmentation plus importante que celle observée précédemment pour les niveaux TSA et BSA a été retrouvée chez les patients avec un cancer colorectal.

Les Figures 41 à 46 montrent les niveaux de TSA des 30 patients avec un cancer colorectal primaire et des 24 patients présentant le carcinome colorectal métastatique ainsi que la population saine et selon le sexe. La moyenne des concentrations de TSA dans le plasma des patients avec métastases était  $584 \pm 99$  mg/l avec un intervalle de 425-895 mg/l et une valeur médiane de 563 mg/l.

Selon le (Tableau 19) les hommes ont montré des valeurs légèrement supérieures à celles des femmes ( $598 \pm 118$  contre  $577 \pm 70$ ), mais la différence n'était pas statistiquement significative. Un intervalle des valeurs de TSA normales de 386 à 782 mg/l, correspondant à la moyenne  $\pm 2$  S.D a été défini. Cette limite supérieure de TSA ne diffère pas beaucoup du seuil de 800 mg/l décrit dans des études précédentes [287]. Seulement 6% ( $n = 2$ ) de personnes en bonne santé ont présentés des valeurs de TSA plus élevées que le niveau du seuil, alors que 73% ( $n = 32$ ) des patients présentant un cancer colorectal métastatique avaient des valeurs de TSA supérieures au seuil. La comparaison entre la population saine et la population présentant un processus tumoral a montré que l'acide sialique libre ne présentait pas de différence significative, alors que la comparaison entre la population des patients avec un processus tumoral avec et sans métastases montre une différence significative de l'acide



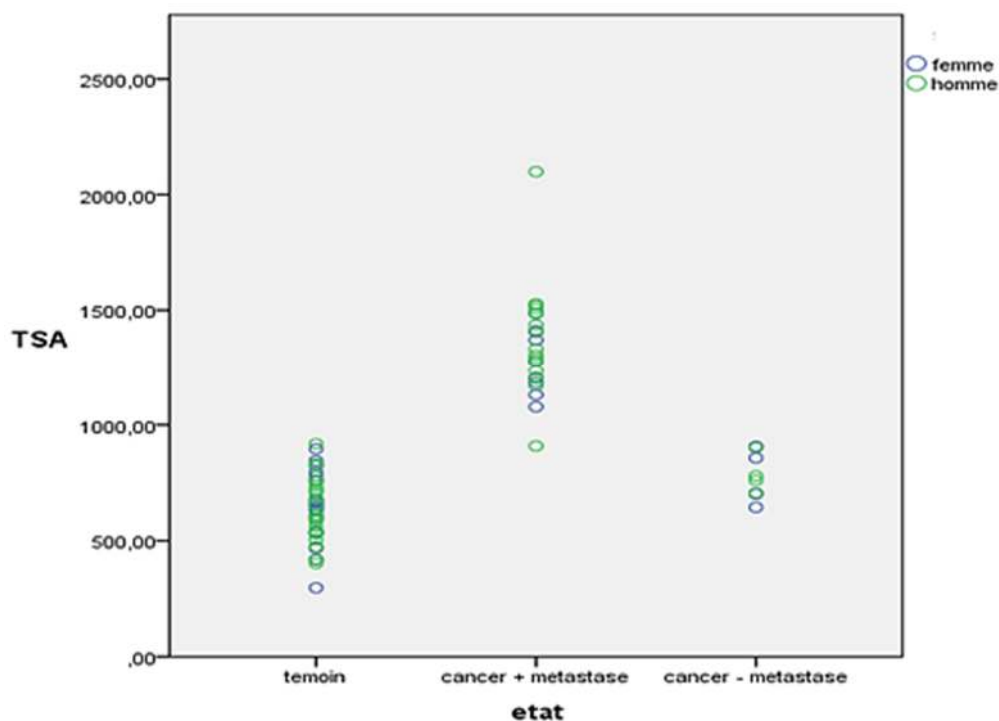
sialique total exprimé par sa concentration ou le rapport de sa concentration sur les protéines totales indiquant sa variabilité dans les processus tumorales métastatiques.

**Tableau 16 :** Valeurs des concentrations de l'acide sialique sous ses différentes formes selon l'état de la maladie chez les patients et les sujets contrôles.

états		TSA	BSA	FSA	TP	BSA/TP	TSA/TP
<b>Témoins</b>	N	41	41	41	41	41	41
	Moyenne	645,94	645,21	8,99	83,1	6,23	6,23
	Ecart-type	142,5	101,10	2,25	7,06	0,97	1,37
	Minimum	296,6	469,25	4,96	72,2	4,53	2,87
	Maximum	918,4	887,11	14,7	103,52	8,57	8,87
<b>Cancer + métastases</b>	N	23	23	23	23	23	23
	Moyenne	134096	1126,44	9,96	73,5	11,0	14,5
	Ecart-type	228,23	297,08	2,81	9,23	3,18	2,49
	Minimum	909,09	417,36	5,25	60,0	4,03	8,78
	Maximum	2099,17	1604,88	15,3	94,0	16,8	22,1
<b>Cancer - métastases</b>	N	8	8	8	8	8	8
	Moyenne	782,7	1077,6	11,9	75,3	11,9	8,27
	Ecart-type	98,13	291,93	2,16	7,52	3,08	1,03
	Minimum	644,8	447,44	7,99	67,0	4,73	6,82
	Maximum	907,7	1343,8	14,0	85,2	14,2	9,60

**Tableau 17** : Valeurs des concentrations de l'acide sialique sous ses différentes formes selon le sexe chez les patients et les sujets contrôles.

Sexe		TSA	BSA	FSA	TP	BSA/TP	TSA/TP
Femmes	N	31	31	31	31	31	31
	Moyenne	825,78	830,93	9,31	77,54	8,43	8,37
	Ecart type	304,14	289,85	2,66	8,07	3,30	3,40
	Minimum	296,96	490,53	5,25	60,90	4,74	2,87
	Maximum	1487,54	1432,63	14,90	93,02	15,16	15,74
Hommes	N	41	41	41	41	41	41
	Moyenne	926,50	859,03	9,71	80,84	8,75	9,46
	Ecart type	396,22	327,95	2,40	9,81	3,68	4,41
	Minimum	402,79	417,36	4,96	63,69	4,03	3,89
	Maximum	2099,17	1604,88	15,73	103,52	16,98	22,21



**Figure 41** : Valeurs des concentrations de l'acide sialique total selon le sexe et l'atteinte.

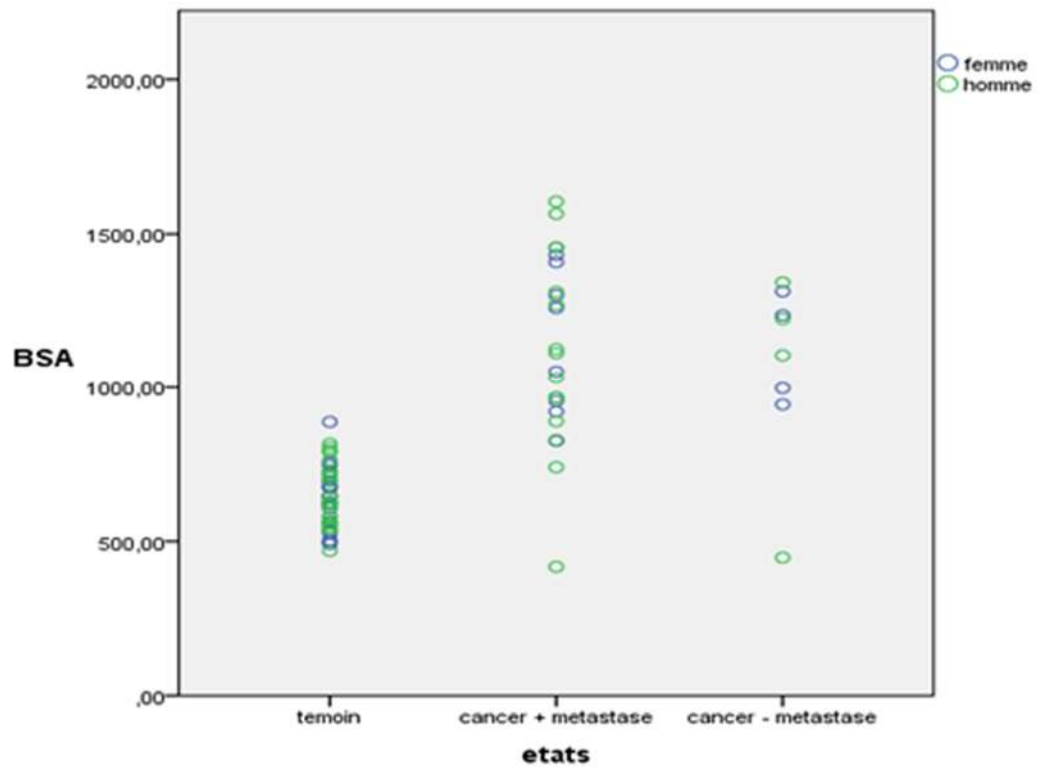


Figure 42 : Valeurs des concentrations de l'acide sialique lié selon le sexe et l'atteinte

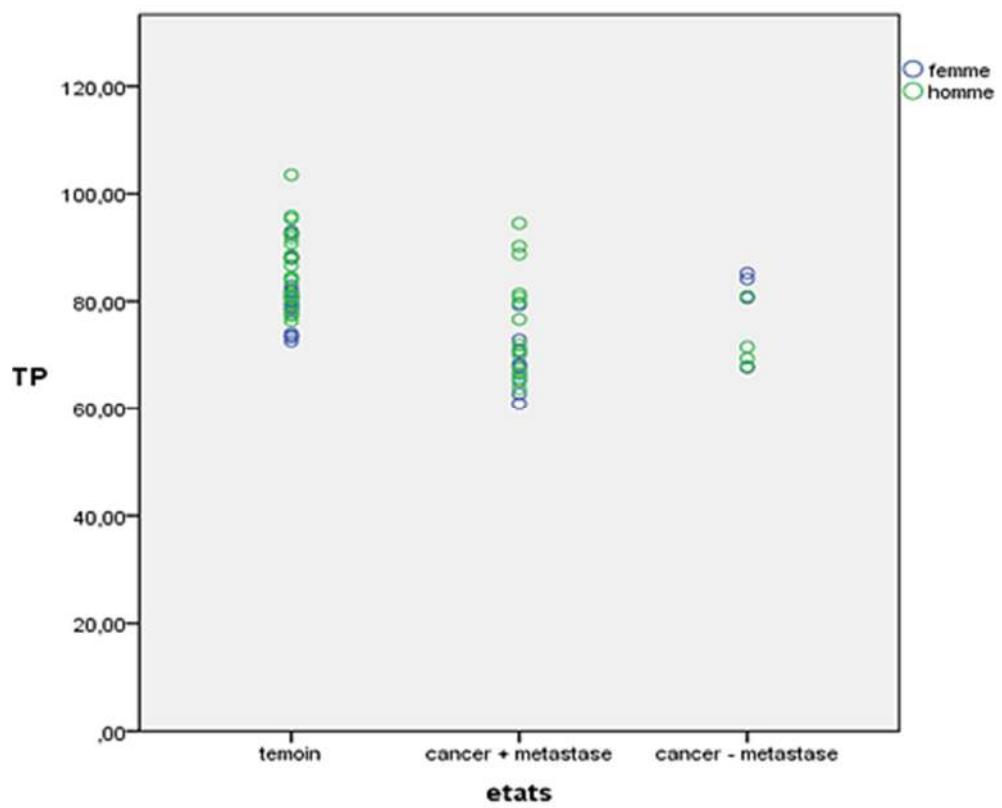
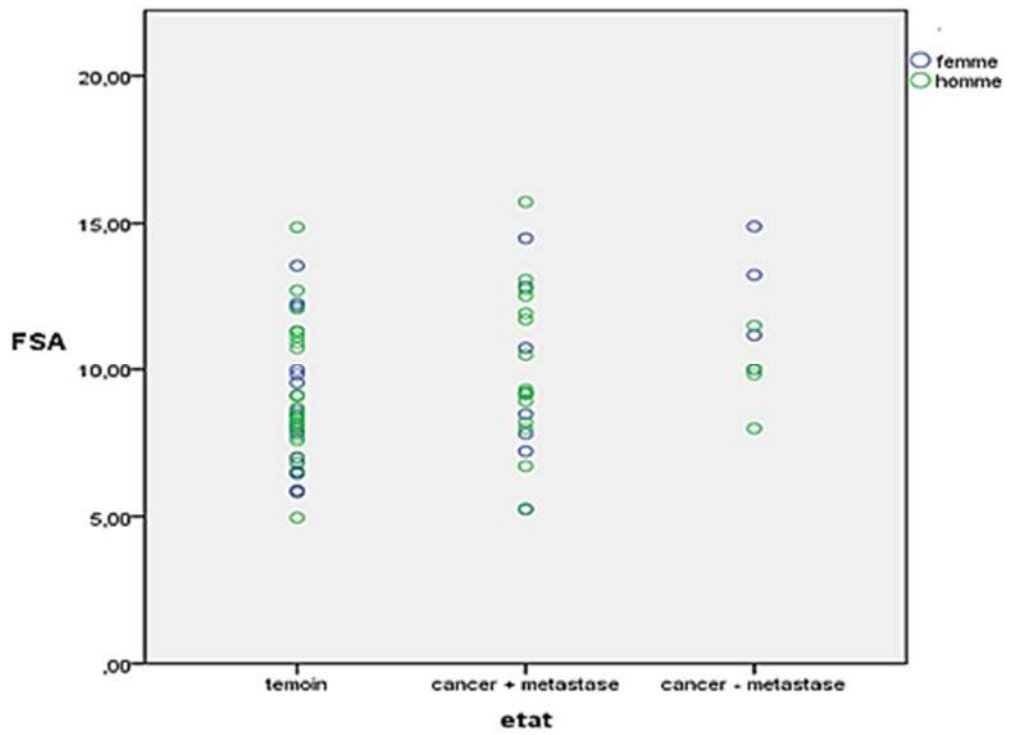
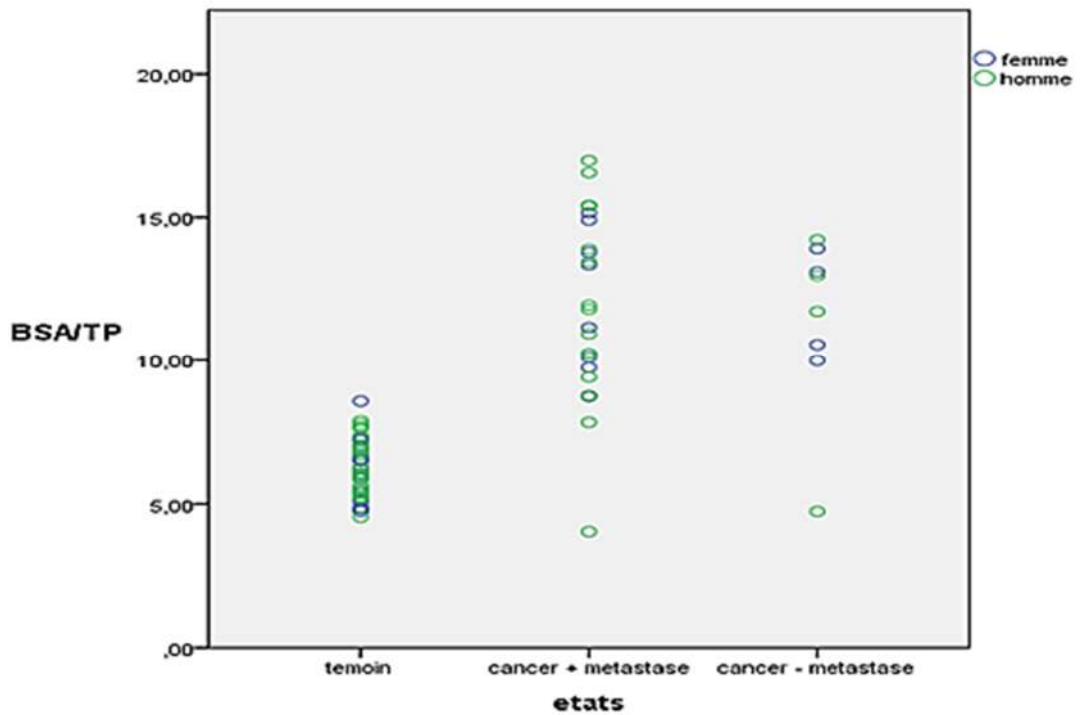


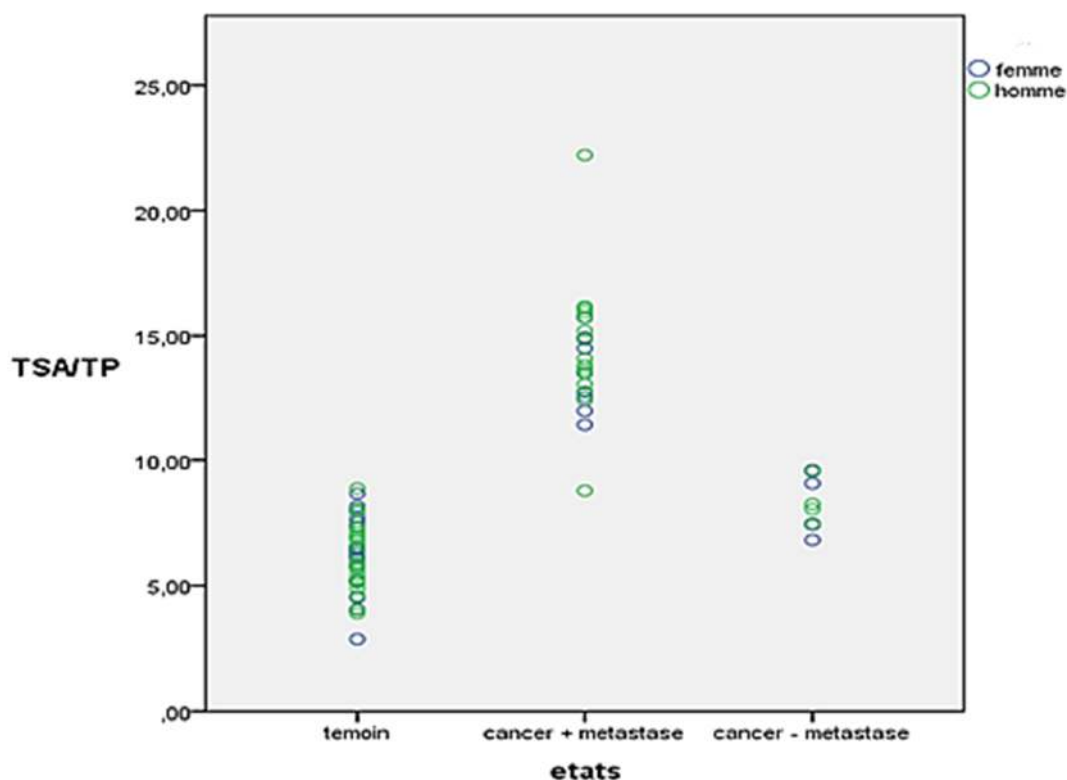
Figure 43 : Valeurs des concentrations des protéines totales selon le sexe et l'atteinte.



**Figure 44 :** Valeurs des concentrations de l'acide sialique libre selon le sexe et l'atteinte.



**Figure 45 :** Valeurs des concentrations de l'acide sialique lié sur protéines totales selon le sexe et l'atteinte.



**Figure 46 :** Valeurs des concentrations de l'acide sialique total sur protéines totales selon le sexe et l'atteinte.

**Tableau 18 :** Comparaison des valeurs de l'acide sialique entre les patients avec métastases et les sujets témoins.

	Tests statistiques <sup>a,b</sup>					
	TSA	BSA	FSA	TP	BSA/TP	TSA/TP
<b>Témoins (N=41)</b>						
<b>Moyenne</b>	645,94	645,21	8,99	83,61	6,23	6,23
<b>± SD</b>	± 142,45	± 101,10	± 2,25	± 7,07	± 0,97	± 1,37
<b>Patients avec et sans métastases (N=31)</b>						
<b>Moyenne</b>	1196,84	1113,72	10,25	73,87	11,77	12,63
<b>± SD</b>	± 319,62	± 291,70	± 2,67	± 8,792	± 3,11	± 3,41
<b>Test t</b>	49,027	38,395	6,362	19,13	39,694	51,544
<b>Signification Statistique p</b>	,000	,000	NS	,000	,000	,000
<b>Différence Significative</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	-	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>

a. Test t

b. Variable de regroupement : états (Témoins / Patients avec et sans métastases)

Les résultats sont exprimés en moyennes ±SD ; N : nombre de patients ; NS : différence non significative  $p > 0,05$  ; Signification statistique :  $P < 0,05$  ; DS : différence significative. TSA : acide sialique total, BSA : acide sialique liée, FSA : acide sialique libre, TP : protéines totale.

**Tableau 19** : Comparaison des valeurs de l'acide sialique entre les patients avec et sans métastases.

	Tests statistiques <sup>a</sup>					
	TSA	BSA	FSA	TP	BSA/TP	TSA/TP
<b>Patients avec métastases (N=23)</b>						
<b>Moyenne ± SD</b>	1340,96 ±228,23	1126,4 ± 297,08	9,96 ± 2,81	73,5 ± 9,23	11,90 ± 3,18	14,15 ± 2,49
<b>Patients sans métastases (N=8)</b>						
<b>Moyenne ± SD</b>	782,47 ± 98,13	1077,6 ± 291,93	11,09 ± 2,16	75,3 ± 7,52	11,39 ± 3,08	8,27 ± 1,03
<b>Test U de Mann-Whitney</b>	,000	87,000	66,000	67,000	87,000	3,000
<b>Signification Statistique p</b>	,000	NS	NS	NS	NS	,000
<b>Différence Significative</b>	DS	-	-	-	-	DS

a. Variable de regroupement : états (cancer + métastases / cancer – métastases)

Les résultats sont exprimés en moyennes ±SD ; N : nombre de patients ; NS : différence non significative  $p > 0,05$  ; Signification statistique :  $P < 0,05$  ; DS : différence significative. TSA : acide sialique total, BSA : acide sialique liée, FSA : acide sialique libre, TP : protéines totale.

### 1.3.4 Discussion

Ces dernières années plusieurs études sur les taux d'acide sialiques dans le sérum des patients avec un cancer colorectal ont été publiées [288][289] et seulement quelque étude sur les niveaux de l'acide sialique dans le sérum des patients avec un adénocarcinome colorectal métastasés.

Dans cette étude nous avons évalué les taux d'acide sialiques dans le sérum de 30 patients avec un cancer colorectal et 24 patients avec un cancer métastasé. Nous avons constaté que dans le sérum, les niveaux de TSA et de BSA, ainsi que les valeurs de TSA/TP et de BSA/TP étaient sensiblement plus élevé chez les patients que chez les sujets sains (Tableau : 18). Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats enregistrés qui décrivent une augmentation de la teneur de l'acide sialique dans le sérum des patients avec un cancer colorectal [290].

Nous avons ensuite évalué les taux d'acide sialiques dans le sérum qui peuvent être utiles pour repérer les cancers avec des métastases. Après avoir déterminé les teneurs de TSA chez les patients avec un cancer colorectal métastatique, nous avons constaté une tendance croissante des taux d'acide sialiques dans le sérum (TSA/TP et BSA/TP) car le processus malin est devenu plus agressif (Tableau : 19) ces résultats semblent confirmer ceux d'autres auteurs décrivant un rapport entre les taux d'acide sialiques dans le plasma et l'évolution de la maladie chez les patients avec un cancer colorectal [291].

Certaines études sur les taux d'acide sialiques chez les patients avec un cancer colorectal étaient contradictoires. Kemmner et al.<sup>[292]</sup> ont décrit une teneur en acide sialique élevé (exprimée comme BSA/TP) dans le tissu des tumeurs colorectales métastasés, alors que Kim et al.<sup>[293][294]</sup> ainsi que Dall' Olio et al.<sup>[295]</sup> ont enregistré une teneur en acide sialique diminuée (exprimée comme TSA/TP) dans les tissus tumoraux métastasés du côlon comparées à son niveau dans le tissu normale des mêmes patients.

Approximativement 99% de tout l'acide sialique est retrouvé dans le sérum des patients avec cancer colorectal liés aux protéines et lipides, nous avons analysé le rapport entre les niveaux du TSA et le BSA dans le sérum. Selon nos données aucune corrélation n'a été retrouvée entre l'acide sialique total et lié (BSA) chez les patients avec un cancer colorectal. Cette différence entre la concentration sérique des taux d'acide sialique totale et lié semble écarter l'hypothèse d'un dysfonctionnement dans la biosynthèse de sialoglycoconjugués dans le tissu tumoral et être la cause d'une augmentation de la teneur en acide sialique dans le sérum des patients. Cependant, puisque des niveaux élevés de l'activité de sialyltransferase ont été retrouvés dans les tissus néoplasiques du côlon<sup>[295][296]</sup>, il est possible que l'augmentation de la teneur de sialoglycoconjugués pourrait être le résultat de la sécrétion à partir de la tumeur vers le sang. Cette hypothèse est supportée par une preuve expérimentale des cellules eucaryotes cultivées qui ont montré une sécrétion des glycoprotéines directement dans le milieu de culture<sup>[297]</sup>. En outre, il a été suggéré que les sialoglycoconjugués de membrane des cellules cancéreuses sont sécrétés non pas dans le cytoplasme, mais dans le liquide extracellulaire<sup>[298]</sup>. Ceci expliquerait l'absence de modification de la teneur en acide sialique dans les tissus et son augmentation dans le sérum.

Cependant, il existe d'autres explications pour l'augmentation dans le sérum de la teneur en acide sialique chez les patients avec un cancer colorectal, non pas comme une augmentation seulement de la concentration des glycoprotéines et des glycolipides dans le sérum, mais également dans le degré de sialylation, de ce fait de plus grande activité de sialyltransferase dans le sérum des patients avec un cancer colorectal a été démontrée<sup>[299]</sup>.

En outre, une diminution de la dégradation des sialoglycoconjugués dans le sérum et/ou une diminution de la clearance de ces derniers par le foie représenteraient également un mécanisme d'élévation des taux d'acide sialiques dans le sérum. D'une autre façon, d'autres auteurs ont proposé que l'augmentation de la concentration en acide sialique dans le sérum des patients présentant le cancer reflète une réaction inflammatoire à la tumeur, conduisant à une plus grande sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation<sup>[300]</sup>.

TSA comprend une petite quantité d'acide sialique libre aussi bien qu'une grande quantité liée aux glycoprotéines et glycolipide. Cet oligosaccharide fixé sur la position N-terminale, est présent sur

la surface de cellules induit une charge électro négative<sup>[294]</sup> comme acide relativement fort (PH= 2.6), il est complètement ionisé à pH physiologique<sup>[301]</sup>. Par conséquent Il a été supposé que les cellules tumorales utilisent leur groupement sialylés de surface pour masquer les déterminants antigéniques et ainsi éviter leur identification par le système immunitaire et faciliter la migration cellulaire et la métastase<sup>[302]</sup>.

Berge et al,<sup>[303]</sup> ont étudié les sialyltransférases dans le sérum des malades avec un cancer, ils ont trouvé une augmentation significative dans leurs activités seulement quand les métastases étaient présentes. De même, Verazin et al.<sup>[304]</sup> ont noté que des niveaux de TSA sont élevés seulement chez les patients avec un cancer colorectal métastatique (stade 4) et non pas chez les patients qui ne présente pas des métastases (stades 1, 2 ou 3).



## 1.4 Etude par spectrométrie de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$

Elle a été effectuée sur les oligosaccharides N-lies présents sur l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules de carcinome de colon humaines (HT-29) et (SW-620), le rôle des N-glycannes et l'acide sialique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la reconnaissance et la fixation aux protéines de la matrice extracellulaire (Laminine, Fibronectine et Collagène IV) et la participation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la migration cellulaire. On a comparé ces résultats à une analyse précédente des structures de N oligosaccharide de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  d'une lignée cellulaire bénigne HCV29 d'épithélium de vessie [305].

### 1.4.1 Type d'étude

Elle rentre dans le cadre d'étude fondamentale de biochimie structurale réalisé dans le service biochimie et génétique moléculaire sous la direction du Pr Michel RIGAU en France durant un stage de formation et perfectionnement.

### 1.4.2 Méthodes

Etude du profil de glycosylation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules cancéreuses SW-620 et des cellules de carcinome de colon HT-29 par spectrométrie MALDI-TOF et leur pouvoir de fixation sur les protéines de la matrice extracellulaire.

### 1.4.3. Protocole d'étude

#### 1.4.3.1 Culture cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées sont des cellules humaines adhérentes cancéreuses du colon : SW620, HT29, obtenu de chez American Type Culture Collection (A.T.C.C., Rockville, MD, USA). Les caractéristiques de ces lignées sont présentées dans le Tableau 20 ci dessous :

**Tableau 20** : Caractéristiques des lignées cellulaires HT 29 et SW 620.

Nom de la lignée cellulaire	Description de la lignée cellulaire	Milieu de culture	Morphologie
SW620	Nodule lymphatique (à partir de cancer de colon)	L-15 + 2mM glutamine + 10% SVF	Epithéliale
HT29	Adénocarcinome colorectal	DMEM + 2mM glutamine + 10% SVF	Epithéliale

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans RPMI 1640 (Sigma) contenant le sérum de Veau foetal (Boehringer) inactivé par la chaleur, les antibiotiques (100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine). La culture cellulaire est réalisé en monocouche dans 95% air/ 5%CO<sub>2</sub> à 37 °C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> humidifié. Après la formation de couches confluentes observées par microscope les cellules ont été lavées deux fois et solubilisé et recueillis dans une solution tampon de phosphates saline et un mélange d'inhibiteur de protéase (Sigma P-2714). Puis les amas cellulaires ont été lysés par sonication (Sonies, Vibra-Cellule). Les extraits de cellules ont été extraient par centrifugation à 15000g pendant 1 h (Ultracentrifugeuse L7-65, Beckman).

#### **1.4.3.2 Chromatographie d'affinité**

La purification de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a été réalisée sur une colonne de Sépharose peptide GD6 (Sigma) comme décrit par Gehlsen, al.<sup>[306]</sup> et modifiée par Litynska, al.<sup>[305]</sup>.

La préparation de la colonne de purification des intégrines a était réalisé selon le protocole du constructeur (Sigma Aldrich). 5 mg de protéines des extraits cellulaires récupérés de la culture cellulaire ont été chargés sur la colonne contenant le peptide GD6-Sépharose pour permettre son interaction avec le ligand immobilisé, le peptideGD6 durant toute une nuit à 4 °C.

La colonne a été ultérieurement éluée avec 0.5 et 1 M NaCl et les fractions de 1ml ont été collectées, concentrées à 0.5 ml par speed Vác VIVA SPIN 50 et analysé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices et explorées avec des anticorps spécifiques.

#### **1.4.3.3 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunodetection des sous-unités $\alpha 3$ et de $\beta 1$**

La déglycosylation des sous-unités des intégrines  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  avant électrophorèse sur gel SDS-PAGE est réalisé par ajout de 0.35 U de peptide N-glycosidase F (PNGase-F) (Boehringer) à la solution et incubée à 37 °C durant toute une nuit.

Des produits élués du GD6-Sepharose avant et après déglycosylation ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 8% dans des conditions non-réductrices selon Laemmli et Favre<sup>[307]</sup>, et transférés sur une membrane de PVDF par fixation sur le gel d'électrophorétique selon Towbin et al,<sup>[308]</sup> durant 1 h à 100 V.

Des anticorps monoclonaux de la sous-unité d'intégrine  $\beta 1$  humaine (clone de souris B3B11 Chemicon), et les anticorps polyclonaux de la sous-unité  $\alpha 3$  humaine (Chemicon) ont été utilisés. Les membranes ont été incubées avec un réactif contenant la phosphatase-alcaline couplé aux IgG (Boehringer).

#### **1.4.3.4 Analyse des chaînes des Glycannes**

Différentes bandes d'électrophorèse de protéine correspondant aux sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  ont été excisées de la membrane de PVDF. Les fragments excisés de membrane de PVDF ont été mis dans des tubes Eppendorf on ajoute le dithiothreitol pour permettre la réduction de la protéine à 60 °C pendant 30 mn. Enfin, les fragments de membrane sont stockés dans une solution de conservation (Boehringer).

#### **1.4.3.5 Digestions par les Glycosidases**

Les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  résultant de la purification par GD6-Sepharose sont traitées avec 0.5mU PNGase F ou avec 10mU de neuraminidase durant 18 H. Comme contrôle, un équivalent de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a été incubé en l'absence des enzymes.

#### **1.4.3.6 Extraction des sucres**

Après déglycosylation, la solution tampon d'incubation était complètement sèche dans un SpeedVacs puis le résidu est dissous dans 10 ml d'eau ultrapure (Milli-Q plus, millipore, Bedford, CA, Etats-Unis) pour l'appliquer à l'élution de la microcolonne.

#### **1.4.3.7 Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS**

Des spectres de masse MALDI MS ont été enregistrés en utilisant un Spectromètre de masse Voyager DE-PRO MALDI-TOF (Applied Biosystème) équipé de l'extraction retardée et opérant en mode réflecteur. Les matrices de MALDI, préparées en dissolvant 25 mg de l'acide 2.5 dihydroxybenzoïque (DHB) dans 1mL de matrice sont déposées sur la plaque métallique sur laquelle on ajoute 1 $\mu$ l de l'analyte<sup>[309]</sup>.

Les tensions d'accélération et le mode réflecteur ont été programmés avec une tension à 20 kilovolts et une extraction retardée à 600 ns pour obtenir les meilleurs scores signal/bruit de fond et la meilleure résolution isotopique. L'étalonnage externe multipoint a été réalisé en utilisant un mélange de peptide oligosaccharide des calibrant Applied biosystèmes. Les valeurs brutes ont été analysées en utilisant le logiciel fourni par le constructeur et ils ont été enregistrés comme des masses monoisotopiques. Les données ont été analysées et exprimées par les moyennes des masses.

#### 1.4.3.8 Analyse des intégrines par ELISA

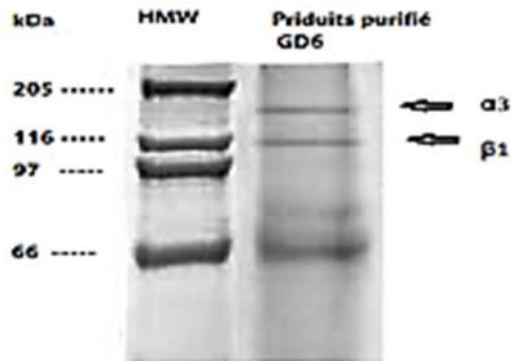
L'analyse par ELISA a été réalisée selon la méthode décrite par Eble et al.<sup>[310]</sup> et modifiée par Pochev' et al.<sup>[311]</sup>. Le produit d'élution par GD6 (traité par neuraminidase, traité ou non par PNGase F) et déposés dans des puits des plaques ELISA contenant laminine, Collagène VI, et fibronectine. Les anticorps anti- $\alpha 3$  et anti- $\beta 1$  (Chemicon) ont été ajoutés ultérieurement.

Les DO pour les fixations non spécifiques mesurées en présence 10 mM de l'EDTA étaient soustraits de la réaction totale pour avoir les valeurs de la réaction spécifique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  aux ligands immobilisés. Chaque mesure a été déterminée en triple et reproduit trois fois. (Annexe : 1)

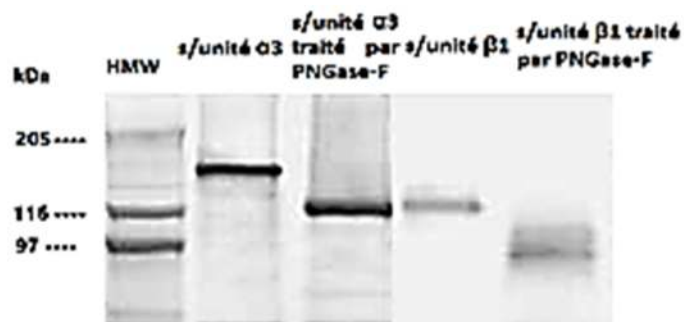
#### 1.4.4 Résultats

Afin de purifier l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des lignées cellulaires SW-620 et HT-29, on a utilisé la chromatographie d'affinité par des microcolonnes à peptide GD6. L'identification des deux bandes distinctes par analyse électrophorétique dans des conditions non-réductrices a été confirmée par Western blot avec des anticorps spécifiques (Figure : 47). Les N-glycannes ont été clivés des deux sous-unités de l'intégrine purifiée des cellules SW-620 et HT-29 en utilisant PNGase F. Le traitement de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  avec PNGase-F a abaissé la masse moléculaire des chaînes  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  de 38 et 47 kDa, respectivement, suggérant la glycosylation des deux sous-unités (Figure : 48).

Les deux sous-unités sont riches en mannose (Man) des oligosaccharides N-liés. Les signaux de 1745.5 m/z et 1882.5 de la sous-unité  $\alpha 3$  ; (Figure : 49 (A)) et à 1882.5 m/z de la sous-unité  $\beta 1$  (Figure : 49(B)), proviennent probablement du type des glycannes riche en mannose (Tableau : 21). Les deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  ont également des types hétérogènes de glycannes, démontrés par la présence des signaux à 1476.5 m/z. Les résultats obtenus à partir du spectre de MALDI MS, indiquent (Tableau :22) que la sous-unité  $\alpha 3$  possède des structure tri-antenne (des valeurs m/z de 1720.5, de 1995.6) et des structures tétra-antenne (valeurs m/z de 2031.3, de 2108.7, de 2129.8, de 2254.7, de 3067.6, de 3722.7) par rapport à la sous-unité  $\beta 1$  (deux tri-antenné avec des signaux à m/z 1720.5, 1995.6, et trois tétra-antenné avec des signaux à m/z 2108.7, 2254.7, 3722.7 (Figure : 50(A) et (B)).

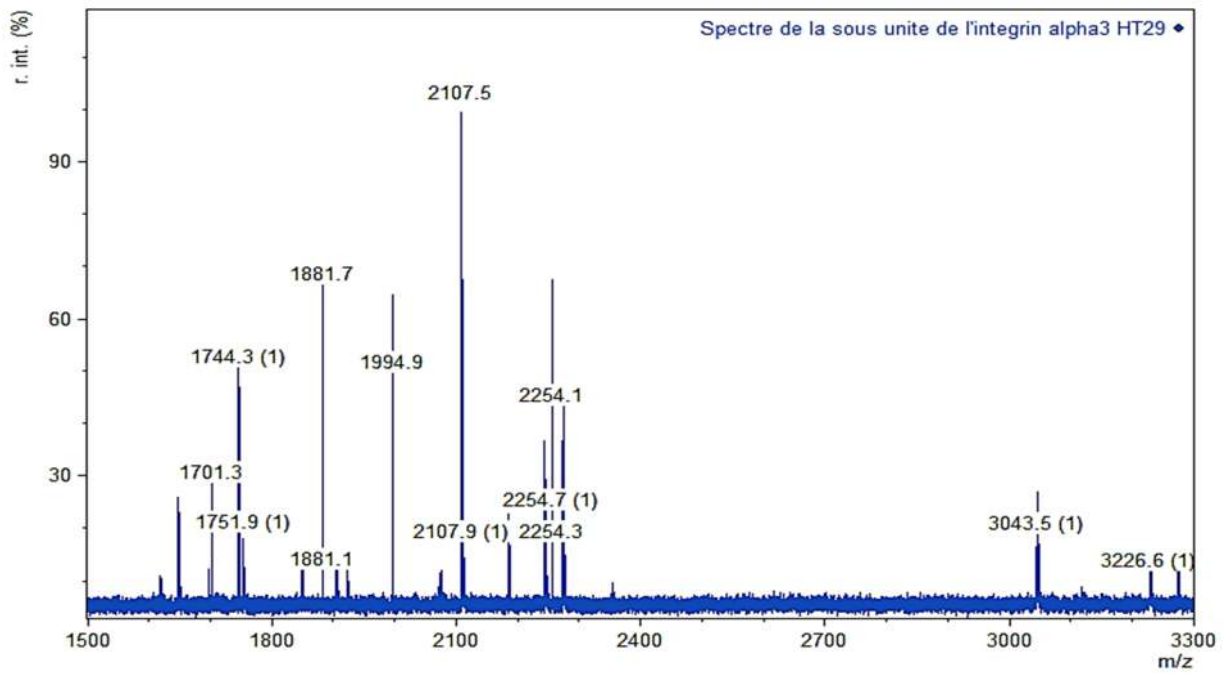


**Figure 47 :** Electrophorèse du produit purifié par colonne GD6 par SDS/PAGE *coloration par bleu de coomasie et identification des sous unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  par des anticorps spécifiques anti- $\alpha 3$  et anti- $\beta 1$ . (HMW marqueurs de masse moléculaire Sigma Aldrich)*

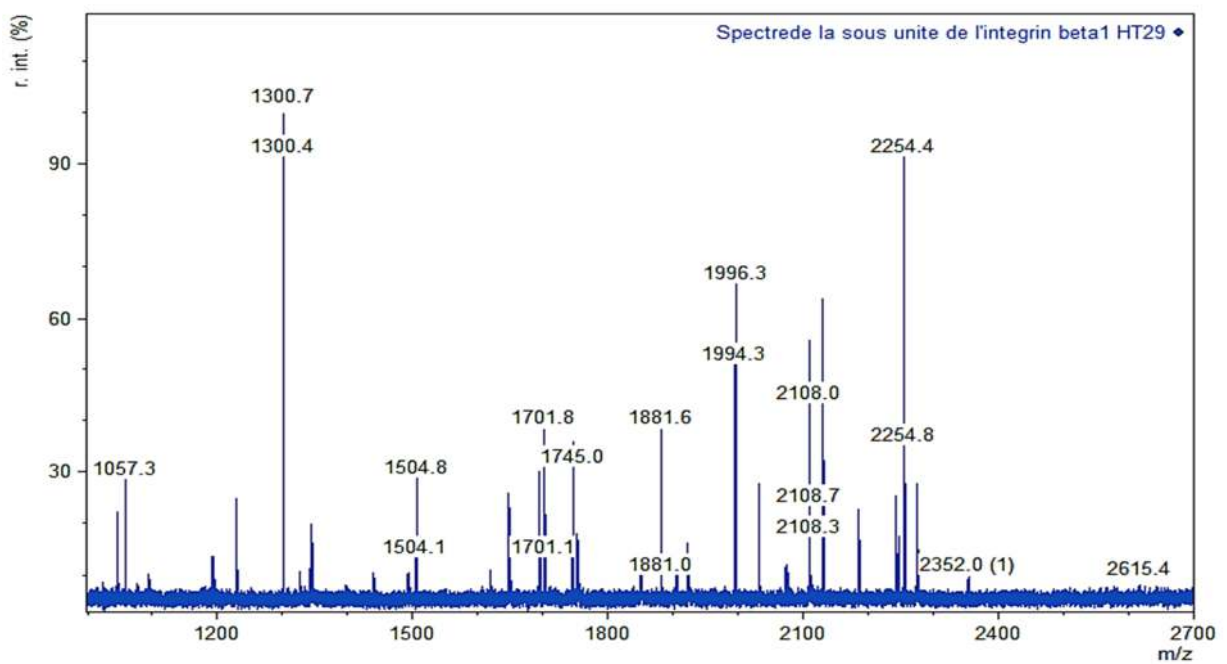


**Figure 48 :** Electrophorèse du produit purifié par colonne GD6 des sous unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  *traité ou non par l'enzyme de déglycosylation PNGase-F. (HMW marqueurs de masse moléculaire Sigma Aldrich)*

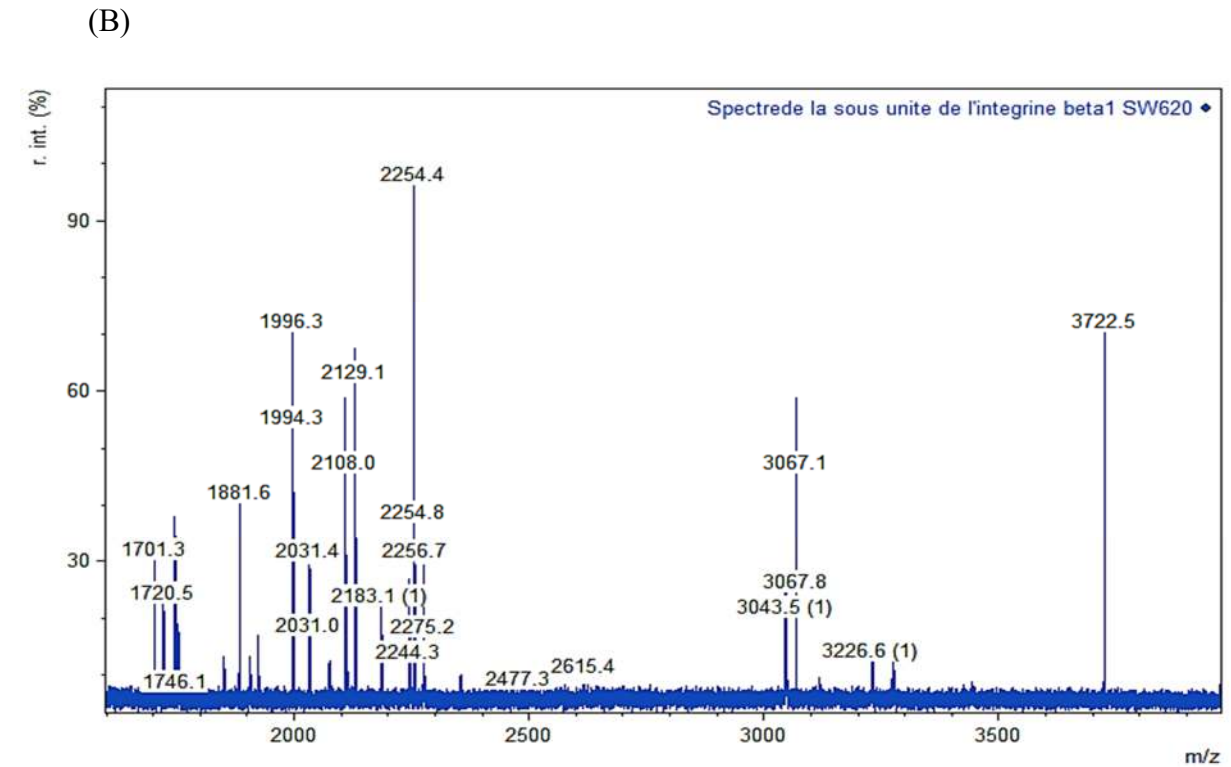
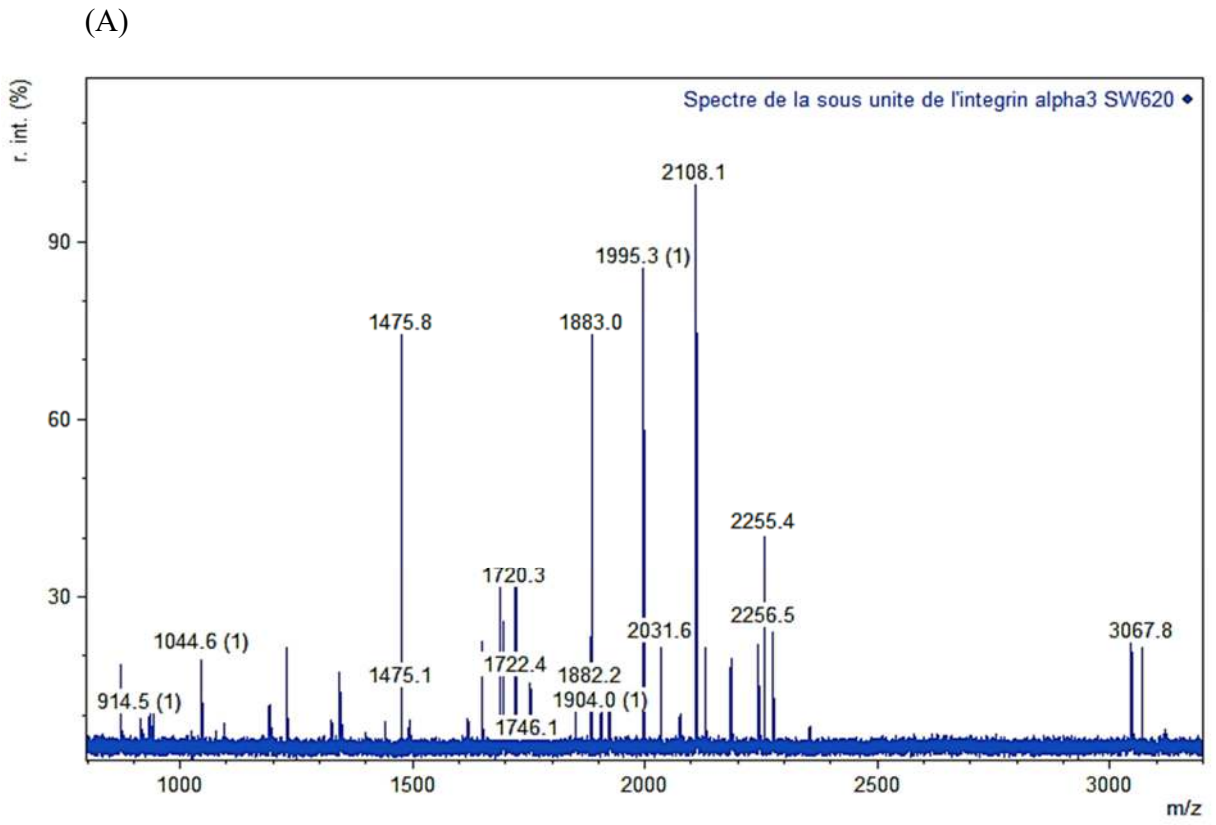
(A)



(B)



**Figure 49 :** Spectre de masse MALDI MS des N-glycannes obtenu par la digestion de PNGase-F de la sous unité  $\alpha 3$ (A) et  $\beta 1$ (B) des cellules HT29.



**Figure 50** : Spectre de masse MALDI MS des N-glycannes obtenu par la digestion de PNGase-F de la sous unité  $\alpha 3$ (A) et  $\beta 1$ (B) des cellules SW620.

Deux types de structure de glycanes de la sous-unité  $\alpha 3$  de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  de HT29, à m/z 1057.3, 2031.6 et seulement une structure de la sous-unité  $\beta 1$  à m/z 2254.7 montre des résidus de fucose. De plus les structures bi-, tri- et tétra-antennés sont fortement sialylés par les signaux quelles présentes (Figure : 51).

Pour déterminer si l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  participe à l'adhérence des cellules, on a réalisé un test ELISA pour étudier l'affinité des intégrines  $\alpha 3\beta 1$  purifié aux protéines principales de la matrice extracellulaire, Ainsi que l'évaluation du rôle de la sialylation des N-glycanes. Pour cela on a testé la fixation de l'intégrine des structures N-glycosylées et desialylées aux protéines de la matrice extracellulaire.

**Tableau 21** : Structures théoriques des glycanes observées par les spectres MALDI MS.

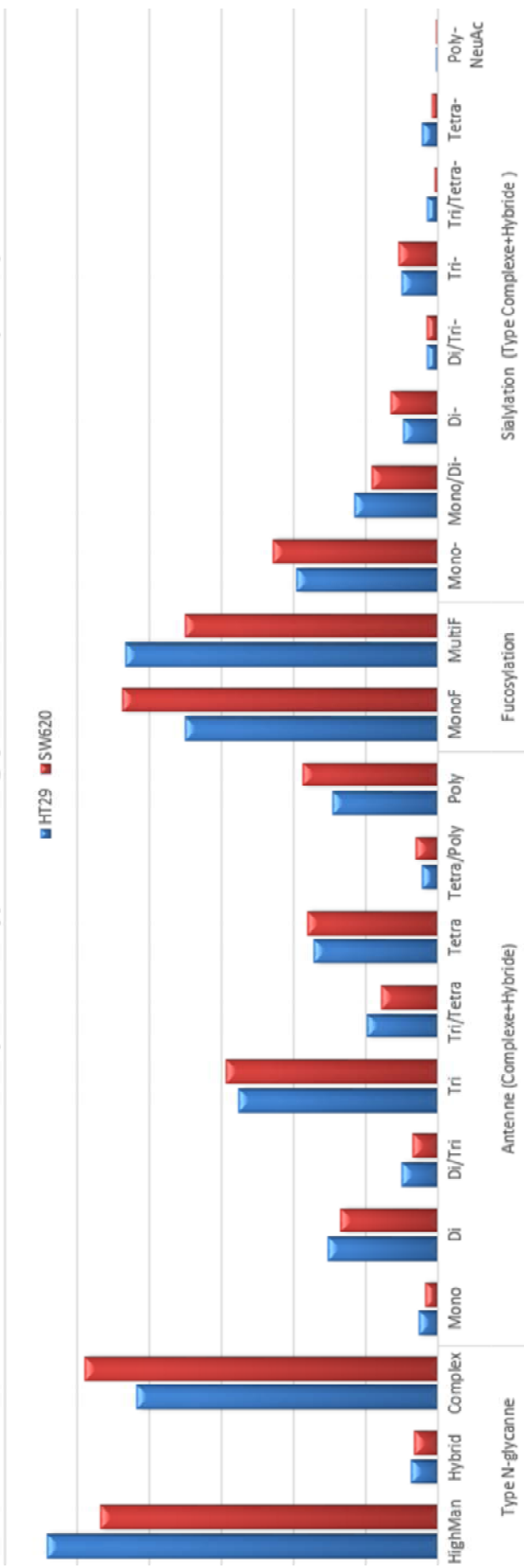
Sousunité $\alpha 3$		Sous unité $\beta 1$		Structure théorique
N° du pic	Masse (m/z)	N° du pic	Masse (m/z)	
1	1057.3			Hex3HexNAc2Fuc
2	1475.8			Hex5HexNAc3
		1	1701.8	Hex5HexNAc4
3	1720.3			Hex4HexNAc5
4	1746.1			Hex8HexNAc2
5	1881.7	2	1881.1	Hex9HexNAc2
6	1882.1			Hex9HexNAc2
7	1994.9	3	1994.3	Hex4HexNAc5Sia
8	1995.1	4	1996.1	Hex4HexNAc5Sia
9	2031.6			Hex4HexNAc6Fuc
10	2108.1			Hex5HexNAc6
11	2108.7	5	2108.7	Hex5HexNAc6
12	2254.1	6	2254.4	Hex4HexNAc6SiaS
13	2254.7	7	2254.8	Hex5HexNAc6Fuc
		8	2256.7	Hex5HexNAc6Fuc
		9	3722.5	Hex7HexNAc6FucSia4



**Tableau 22** : Compositions des glycanes proposées pour les signaux obtenus par MALDITOF/MS.

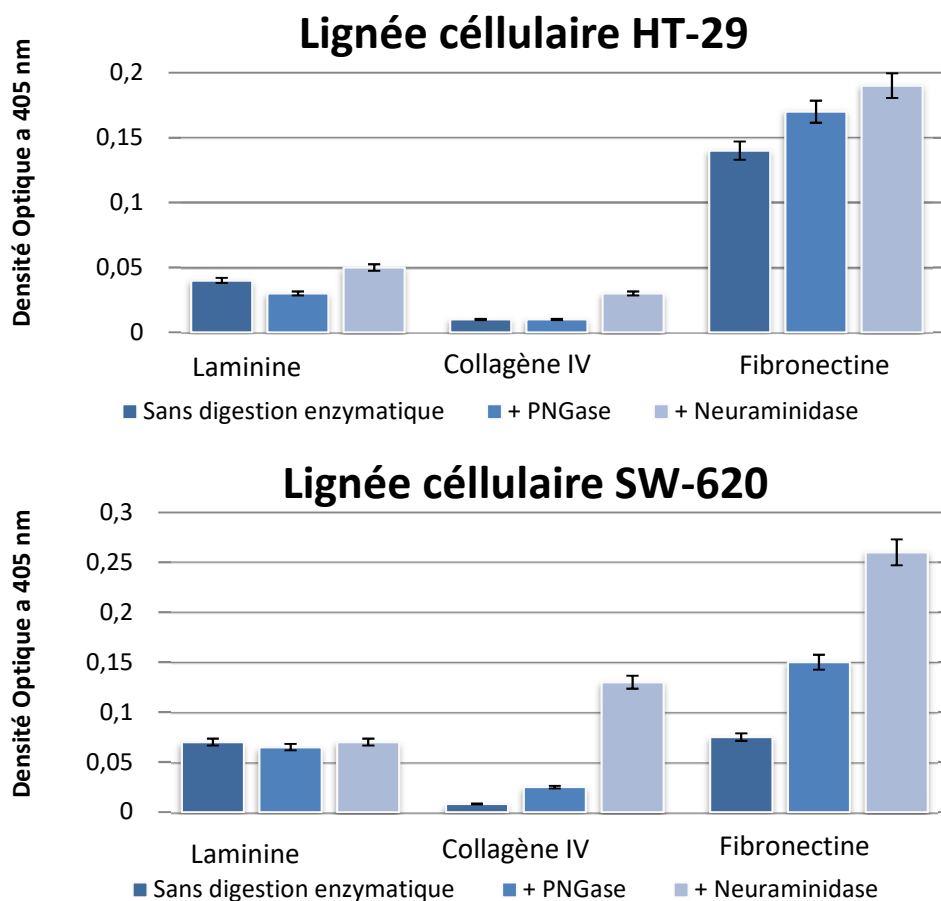
N° du Pic	Masse	Structures		
Observé pour les deux lignées	Mesuré	antennes	Fuc	Neu5Ac
1	1476.5	Bi-antenne	0	0
2	1745.5	Bi-antenne	0	0
3	1882.5	Bi-antenne	0	0
4	1720.5	Tri-antenne	0	0
5	1995.6	Tri-antenne	0	1
7	2031.3	Tétra-antenne	1	0
8	2108.7	Tétra-antenne	0	0
9	2129.8	Tétra-antenne	0	0
10	2254.7	Tétra-antenne	1	0
11	3067.6	Tétra-antenne	1	2
12	3722.7	Tétra-antenne	1	4

### Pics caractéristiques des types des N-glycannes selon l'intensité relative(100%)



**Figure 51 :** Diagramme de distribution des différents types des N-glycannes des deux lignés cellulaires HT29 et SW620.

L'intégrine  $\alpha3\beta1$  purifiée des lignées de cellules SW620 et HT-29 suivies par la digestion de PNGase F et/ou le traitement par la neuraminidase, a été utilisé pour étudier la fixation directe à la laminine, le collagène IV et la fibronectine. Suivant les résultats (Figure 52), l'intégrine  $\alpha3\beta1$  soluble de la lignée cellulaire HT-29 est liée fortement à la fibronectine, et à moindre degré à la laminine. L'intégrine  $\alpha3\beta1$  de la lignée SW-620 se lie plus faiblement à la laminine et la fibronectine. Aucune fixation de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  de l'une ou l'autre des lignées cellulaires au Collagène IV n'a été constaté. Après la déglycosylation de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  des cellules SW-620, cette dernière se fixe plus faiblement au Collagène IV et presque deux fois moins à la fibronectine que l'intégrine non traitée, alors que l'intégrine de la lignée cellulaire HT-29 a montré une fixation augmentée seulement à la laminine. La désialylation a amélioré sensiblement la fixation au Collagène IV et à la fibronectine dans le cas de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  de SW-620, et à la laminine dans le cas des cellules HT-29. Aucun effet sur la fixation de la partie N-glycosylée et désialylée des intégrines  $\alpha3\beta1$  des cellules SW-620 à la laminine n'a été observé.



**Figure 52 :** Diagramme de fixation des protéines de la matrice extracellulaire aux intégrines  $\alpha3\beta1$  purifiées déglycosylées par PNGase F et/ou traitées par neuraminidase.

### 1.4.5 Discussion

La métastase des cellules tumorales est associée à un profil de glycosylation différent des glycoprotéines de surface de cellules<sup>[312][313]</sup>, en particulier la sialylation terminal<sup>[314]</sup> et les branchements  $\beta(1,6)$  des oligosaccharides N-liés<sup>[315][316]</sup>. Il a été démontré que la progression de cellules cancéreuses vers un processus métastatique est directement associée à l'augmentation du niveau des branchements  $\beta(1,6)$  des oligosaccharides N-liés qui étaient le résultat de l'hyperactivité de l'enzyme GlcNAc-TV<sup>[317]</sup>. Ces derniers oligosaccharides possèdent la structure GlcNAc  $\beta(1,6)$  Man $\alpha(1,6)$ Man-R qui peut être caractérisée par la reconnaissance spécifique par agglutination au lectine (PHA-L)<sup>[318]</sup>.

Dans notre étude nous décrivons les oligosaccharides N-liés présent sur l'intégrine  $\alpha3\beta1$  des cellules de carcinome de colon HT29 et SW620, le rôle de N-glycannes et l'acide sialique de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  dans la reconnaissance et la fixation aux protéines de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine et Collagène IV) et la participation de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  dans la migration cellulaire. Nous comparons ces résultats à une analyse précédente des structures de N-oligosaccharide de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  d'une ligné cellulaire bénigne HCV29 d'épithélium de vessie<sup>[319]</sup>. Nos résultats indiquent la présence de N-glycannes riche en mannose dans les deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  similaire à l'intégrine de la ligné cellules épithéliales HCV29. Eble et al.<sup>[320]</sup> ont montré la présence des chaînes de glycannes N-liés riches en mannose dans l'intégrine  $\alpha3\beta1$  par la réaction d'agglutinine à la concanavaline A (ConA) et aux lectines de pisum sativum (PSA) qui reconnaissent l' $\alpha$ -mannosyl et le glucosyl des résidus terminaux. Ils ont proposé que les chaînes latérales oligosaccharidiques puissent stabiliser la région C-terminal des intégrines et protègent le domaine extracellulaire de la dégradation protéolytique. D'autres études précédentes ont également indiqué la présence des glycannes riches en mannose dans l'intégrine  $\alpha3\beta1$  des cellules de mélanome<sup>[321]</sup>. Tous ces résultats proposent que les oligosaccharides riche en mannose sont présents à des proportions importantes dans les deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  dans les lignées néoplasiques par rapport aux lignés cellulaires normales. Cela indique que la plupart des changements communs des glycoprotéines des cellules tumorales sont liés à la présence des structures plus importantes et plus branchée des oligosaccharides N-liés.

Le  $\beta(1,6)$ GlcNAc (N-acetylglucosamine) des N-glycannes est branché selon la configuration structurale bi-, tri- et tétra-antenne communes des oligosaccharides représentant un sous-ensemble complexe des N-glycannes<sup>[322]</sup>. L'importance des oligosaccharides N-liés branché dans les métastases de tumeur a été montrée dans les expériences rapportées par Laferte et Dennis<sup>[323]</sup> aussi bien que Guo et al.<sup>[324]</sup>. Particulièrement, une forte corrélation entre un plus grand nombre de structures branchées de  $\beta(1,6)$  des oligosaccharides complexes et le potentiel métastatique<sup>[325]</sup>.

Nos résultats sur les cellules cancéreuses HT29 et SW620 a indiqué que la majorité des N-glycannes de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  sont structurellement des chaînes complexes bi, tri, et tétra-antennées et seulement dans la lignée cellulaire SW620 où le type complexe des oligosaccharides tetra-antennés et sialylés (Hex7HexNAc6FucSia4) était présent.

La présence des structures branchée  $\beta(1,6)$  sur la sous-unité  $\beta 1$  des deux lignées cellulaires a été confirmée par le signal à m/z 2107.2 et 2254.6 correspondent aux structures complexes N-acetyllactosamine tetra-antennés.

En revanche, pour le cas de la sous-unité  $\alpha 3$  de la lignée cellulaire SW620, tous les glycoformes à m/z 2207.2, 2108.1 et 2254.6 sont possibles. Nos données indiquent que les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  des intégrines  $\alpha 3\beta 1$  des lignées cellulaires humaine du colon HT29 et SW620 expriment les structures branchées  $\beta(1,6)$  suggérant que ces chaînes de glycannes associées au cancer puissent moduler l'adhérence des cellules tumorales en affectant les propriétés de liaison de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a ces ligands.

La fucosylation et la sialylation sont tous deux des modifications très communes des oligosaccharides. En comparaison de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules HCV29, les glycannes des deux sous-unités sont fucosylés, trois structure de type glycannes de la sous-unité  $\alpha 3$  de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  de HT29, à m/z 1054.7, 2031.3, 2257.7 et les structures des deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  de SW620 à m/z 2257.7 et 3722.7 montrent des résidus de fucosyl. Nos résultats ne correspondent pas avec l'observation de Kawano et al.<sup>[326]</sup> qui a constaté que le fucosylation des structures N-glycannes des intégrines des mélanomes était plus intense chez la souris a faible pouvoir métastatique que dans les cellules parentales à pouvoir métastatiques élevé ainsi que Miyoshi et al.<sup>[327]</sup> qui a constaté que la surexpression d' $\alpha(1-6)$ fucosyltransferase dans les cellules humaines de tumeur hépatique a réprimé l'apparition de métastase intra hépatique.

À la différence des cellules HCV29 normales, le complexe structural des N oligosaccharides de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules HT29 et SW620 est fortement sialylé. D'ailleurs, parmi les complexes structuraux des types N-glycannes de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules SW620, la structure Hex7HexNAc6FucSia4 est fortement sialylé. Cette structure n'a pas été constatée dans l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules épithéliales normales de vessie. Ces résultats sont comparables à certains données<sup>[328]</sup> indiquant la sialylation de structure de branchement  $\beta(1,6)$  plus importante dans la plupart des modifications communes de N-glycosylation au cours de la transformation maligne. La charge négative et la position terminale de l'acide sialique contribuent à sa capacité de perturber l'interaction entre les molécules et même entre les cellules<sup>[329]</sup>.

Contrairement à l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules épithéliales bénignes HCV29 de la vessie, pour les deux sous-unités des cellules du cancer du côlon HT29 et SW620, le glycanne avec un signal à

m/z 2254.7 était présent, auquel un sulfaté pourrait être attribué à la structure tétra-antenné. Indépendamment des oligosaccharides sialylés, les résidus sucres sulfatés sont les seules molécules qui porte une charge négative nette à pH physiologique dans les glycoprotéines<sup>[326]</sup>. On sait que les oligosaccharides sulfatés des glycoprotéines avec charge négative sont importantes dans l'adhérence de cellules pour la matrice extracellulaire<sup>[330]</sup>. Ils s'avère qu'ils sont également un motif important des oligosaccharides des lignés cellulaires humaines de carcinome de côlon avec un pouvoir métastatique élevée<sup>[331]</sup>.

Un certain nombre de questions au sujet du rapport entre le phénotype malin et les structures des complexes branchés  $\beta(1,6)$  reste à élucider, mais un certain nombre de travaux<sup>[332]</sup> de recherche ont montrés que les oligosaccharides N-liées peuvent réduire l'adhérence de la cellule et facilitent la migration des cellules et l'invasion. L'expression des structures des complexes branchées GlcNAc( $\beta$ 1,6) des oligosaccharides sur les intégrines ou d'autres récepteurs d'adhérence peuvent faciliter le contact cellule à cellule et les interactions avec la matrice extracellulaire pour accélérer la motilité de cellules.

Diverses protéines de la matrice extracellulaire ont été proposées pour être des ligands pour l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  mais elles ont été étudiées sur la base d'étude d'adhérence de cellules. Ces propriétés d'adhérence de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  purifié avec la laminine, la fibronectine, et au collagène VI ont étaient réalisés dans notre étude afin de comprendre le rapport entre la structure d'ose et la migration cellulaire, nous avons étudié l'effet de la desialylation et de la déglycosylation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ .

Bien qu'on ne connaisse pas si le profil de glycosylation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  peut moduler leur rôle biologique dans la cascade des réactions qui induisent la métastase, il est démontré que les oligosaccharides N-liés peuvent gêner l'interaction protéine-protéine. L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  est un récepteur de laminin-1, de laminin-10, de la fibronectine, et du collagène IV, avec une affinité plus intense à la laminin-5. Ainsi sa participation dans l'adhérence aux protéines de la matrice extracellulaire et à la migration de plus le rôle des oligosaccharides de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans ces processus a été vérifié<sup>[328]</sup>. L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules SW620 s'est avérée se fixer à la laminine et à la fibronectine avec la même affinité, mais ne se fixent presque pas avec le collagène IV, alors que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules HT29 se fixe très fortement à la fibronectine et faiblement à la laminine et aucune adhérence au collagène IV n'a été constatée. Eble et al<sup>[333]</sup> ont démontré que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  solubles purifiée se fixe fortement seulement à la laminine-5 et à la laminine-10 placentaire, mais ne se fixe pas à la fibronectine et aux collagènes.

Cependant, la digestion enzymatique de l'acide sialique a restauré le pouvoir d'adhérence de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  au collagène IV dans les cellules SW620 et l'élimination des N-glycannes et l'acide sialique a augmenté la fixation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  à la fibronectine et à moindre degré au collagène

IV seulement dans les cellules cancéreuses HT29. Les résultats présentés ici supportent l'hypothèse que les N-glycannes sont importants dans les interactions des cellules à la matrice. La fixation à la fibronectine de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  desialylée des cellules SW620 était sensiblement plus élevée que pour l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules HT29, qui se lie avec la même force avant et après le desialylation. Ceci peut être le résultat de la teneur deux fois plus élevée de l'acide sialique dans le carcinome de colon métastatique que dans les cellules cancéreuses non métastatiques. Ces données illustrent le rôle direct de l'acide sialique dans l'interaction de ligand-récepteur. Nos résultats sont en accord avec l'observation que la desialylation enzymatique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  améliore la fixation à la fibronectine<sup>[334]</sup>. Dans les glycoprotéines N-liés, l'acide sialique est fixé au galactose avec une liaison  $\alpha(2.6)$  et  $\alpha(2.3)$ , identifiée par les lectines MAA et SNA, respectivement. L'augmentation de la sialylation des liaisons  $\alpha(2.6)$  des récepteurs de surface de cellules a été associée à la tumorigénèse et à la métastase. Lin et al.<sup>[335]</sup> ont montré que la sialylation des  $\alpha(2.6)$  de la surface des cellules contribue à l'augmentation de l'adhérence au collagène IV et la capacité d'envahissement. Ces résultats contredisent nos observations sur l'adhérence de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  au collagène IV où la desialylation a restauré l'adhérence des cellules SW620. La seule explication pourrait être dans les glycannes ou bien seulement dans la liaison  $\alpha(2,3)$  à l'acide sialique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  qui était présente.

Des niveaux élevés de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  sont observés dans plusieurs types de tumeur métastatique, et ont été associés à la migration et à l'envahissement locorégional<sup>[329]</sup>. La comparaison des profils de glycosylation d' $\alpha 3\beta 1$  de l'intégrine des cellules normales et des cellules cancéreuses a montré une sialylation plus élevée dans les cellules cancéreuses, une moindre fucosylation, la présence des structures de branchement et la présence des résidus sulfates dans les deux sous-unités de cette intégrine. Nous avons également montré que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  peut jouer un rôle dans la migration cellulaire dans les cellules HT29 et SW620 sur la fibronectine. Le fonctionnement de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  peut être modifié par la glycosylation : ceci peut être considéré comme un mécanisme dans la régulation des intégrines.

## ***CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES***



## 1. Conclusion

La glycosylation fait partie des modifications post-traductionnelles les plus courantes. Elle possède un rôle majeur dans la fonction biologique des protéines. Cependant, la caractérisation des glycoprotéines reste complexe en grande partie à cause de leur grande hétérogénéité. Afin de caractériser les protéines N-glycosylées, plusieurs critères sont à prendre en compte comme la quantité de matériel, la taille de la glycoprotéine, son hétérogénéité et sa localisation cellulaire, tissulaire ou sérique. Ainsi, la caractérisation de protéines N-glycosylées nécessite la mise en place d'une méthodologie bien définie qui demande une grande expertise et doit être adaptée au contexte de l'étude.

Par la présente étude, nous proposons une analyse globale des glycoprotéines associées aux tumeurs. Dans la première partie de notre étude, nous avons analysé en détail les dosages quantitatifs des glycoprotéines par des méthodes indirectes chez des patients présentant des pathologies tumorales. Pour cela, l'étude a été réalisée par plusieurs approches, dans une première phase le dosage des mucoprotéines, le dosage du fucose et de l'acide sialique chez des patients avec des tumeurs. Dans la seconde phase, nous avons analysé le profil de glycosylation des intégrines de lignées cellulaires pour compléter nos données sur la spécificité des parties glycaniques des glycoprotéines impliquées dans le développement et la migration des cellules tumorales.

Notre étude a été entreprise par l'évaluation de l'augmentation des mucoprotéines dans le sérum des patients présentant un cancer à différents stades d'évolution. Cette dernière a été effectuée sur 47 patients souffrant d'un cancer diagnostiqué par examen anatomopathologique. Les données obtenues ont été comparées à des contrôles sains. La différence s'est avérée significative, ce qui a permis de suggérer que l'augmentation des mucoprotéines du sérum dans le cas d'un cancer, est due à des altérations biochimiques et pathologiques responsables de la maladie.

La mesure des mucoprotéines dans le sérum est une méthode de laboratoire facile à réaliser, mais souffre d'une faible sensibilité et spécificité technique. Pour cette raison, nous avons entrepris une étude plus détaillée des glycoprotéines par l'identification et le dosage de composants plus spécifiques des glycoprotéines par rapport au mucoprotéines.

Les glycoprotéines dans le sérum peuvent être classées dans 2 groupes. Le premier groupe se compose des glycoprotéines qui contiennent une petite quantité d'ose plus spécifique comme le fucose et facilement précipité par les précipitants communs de protéine tel que l'acide trichloracétique, l'acide perchlorique, ou l'acide picrique. Dans le 2ème groupe, ce sont des mucoprotéines, qui contiennent un grand nombre d'hydrates de carbone et sont solubles dans les solutions d'acide trichloracétique.

L'augmentation du niveau de fucose dans la fraction insoluble du le sérum chez les malades présentant une pathologie maligne par des acides est due à une élévation de certaines glycoprotéines particulières dans le sérum. La quantification du fucose dans cette fraction peut améliorer la sensibilité du test de dosage des glycoprotéines et élucider la source et le mécanisme de l'augmentation accrue de sa teneur.

Dans cette étude nous avons voulu déterminer la concentration du fucose dans deux fractions différentes suite à des précipitations par une solution d'acide perchlorique. La première est la fraction de fucose insoluble et le second est la fraction soluble chez les patients présentant un processus malin, bénin et une population de sujets sains. Les résultats indiquent que l'augmentation du niveau de la concentration de fucose dans la fraction insoluble est principalement responsable des taux élevés de fucose dans le sérum des malades avec un processus malin.

La teneur de fucose dans la fraction insoluble dans l'acide perchlorique du sérum est augmentée de manière significative chez les malades avec un cancer. Puisque la teneur de fucose dans les fractions insolubles suit une progression linéaire avec la teneur totale de fucose, ceci nous a permis d'attribuer l'augmentation du niveau du fucose total dans le sérum des malades avec un cancer à l'augmentation de fucose contenu dans les glycoprotéines.

Ainsi, il est évident que les niveaux élevés de fucose dans le sérum dans le carcinome n'excluent pas d'autres maladies dégénératives et prolifératives. De plus, la taille de la lésion et de l'inflammation secondaire pourrait modifier ces niveaux. De ce fait on a cherché à doser un autre paramètre plus intéressant.

Notre objectif suivant était de réaliser le dosage de l'acide sialique qui est un composant très important des glycoprotéines. De plus, La majorité des patients qui présentaient des tumeurs malignes ont montré une concentration élevée de taux d'acide sialique dans le sérum. Des niveaux augmentés ont été enregistrés chez les patients présentant une leucémie, un mélanome malin, aussi bien que dans le cas du cancer endométrial, du cancer du sein, du poumon, de la prostate, de la vessie, du côlon et de l'ovaire. Pour cela, nous avons voulu montrer que les taux d'acide sialiques dans le sérum pourraient être utiles pour repérer les cancers avec des métastases.

En premier lieu les taux d'acide sialiques dans le sérum ont été évalués chez des patients ayant un adénocarcinome colorectal et comparés à des sujets sains. A partir de nos données, il est évident que la concentration moyenne d'acide sialique totale sérique (TSA) est sensiblement plus élevée chez les patients avec un cancer colorectal que chez les sujets témoins. La valeur du TSA chez ces patients montre une augmentation de 71%.

Dans un deuxième lieu nous avons évalué les taux d'acide sialiques dans le sérum afin de l'utiliser pour repérer les cancers avec des métastases. Après avoir déterminé les teneurs de TSA chez

les patients avec un cancer colorectal métastatique, nous avons constaté une tendance croissante des taux d'acide sialiques dans le sérum (TSA/TP et BSA/TP) lorsque le processus malin est devenu plus agressif. Ces résultats semblent confirmer ceux enregistrés par d'autres auteurs décrivant le rapport entre les taux d'acide sialique dans le plasma et l'évolution de la maladie chez les patients avec un cancer colorectal.

Dans le contexte d'une approche structurale, nous avons étudié les oligosaccharides N-liés présents sur l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules de carcinome de colon humaines (HT-29) et (SW-620) par spectrométrie de masse MALDI-TOF, le rôle de N-glycannes et de l'acide sialique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la reconnaissance et la fixation aux protéines de la matrice extracellulaire (Laminine, Fibronectine et Collagène IV) et la participation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans la migration cellulaire.

Après avoir rappelé dans notre introduction bibliographique les principales méthodes couramment utilisées pour la caractérisation des protéines glycosylées, nous avons montré les techniques dans lesquelles des progrès ont été faits pour améliorer les méthodologies d'analyses des glycoprotéines et en particulier la description des techniques d'étude des micro-hétérogénéités de la N-glycosylation dans le cas d'échantillons de faibles quantités.

Nous avons utilisé dans ce travail les ions diagnostiques formés à partir des glycannes libérés par déglycosylation. Ces ions diagnostiques permettent de localiser dans le courant d'ions total les spectres correspondants à des glycannes déduits à partir des ions théoriques correspondants. La littérature montre en fait que les ions diagnostiques ont été très peu utilisés dans la stratégie de caractérisation des glycoprotéines dans les cas d'échantillons en très faibles quantités (par exemple extrait de bandes de gel 1D ou 2D). C'est pourquoi nous avons travaillé sur des échantillons purifiés par chromatographie d'affinité sur le peptide GD6.

Ainsi, la caractérisation des glycoprotéines qui porte de plus en plus, sur des échantillons en très faible quantité, dans des mélanges complexes et sur des espèces très hétérogènes, nécessite le développement de nouvelles méthodologies adaptées à ce type d'échantillon.

Nous avons focalisé notre attention sur la caractérisation de la micro-hétérogénéité des protéines N-glycosylées. La stratégie utilisée est basée sur l'analyse de chaînes de glycannes et l'utilisation des ions diagnostiques issus de la fragmentation spécifique des N-glycannes pour obtenir la distribution des différents glycoformes portées par un même peptide. Nous avons montré que le rôle central que peuvent jouer les ions diagnostiques pour l'étude des glycannes repose sur les possibilités instrumentales. Par conséquent, selon le cas, il faudra utiliser différemment les possibilités de fragmentation de l'instrument.

Par comparaison des profils de glycosylation de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  des cellules cancéreuses, il a été constaté une sialylation plus élevée dans les cellules métastatiques, une fucosylation marquée, la

présence de structures de branchement et la présence de résidus sulfatés dans les deux sous-unités de cette intégrine. On a également montré que l'intégrine  $\alpha3\beta1$  peut jouer un rôle dans la migration des cellules SW-620 par ses propriétés d'adhésion sur les protéines de la matrice extra cellulaire.

Ainsi, dans une vision ultérieure, il est intéressant de réaliser des dosages des glycoprotéines dans le sang et les cellules de prélèvement de masse tumorale des sujets malades, afin de tenter de déterminer leur relevance. Ces marqueurs pourraient être pertinents pour proposer une aide diagnostique et pronostique aux cliniciens.

## **2. Perspectives**

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ne constituent pas un champ de recherche fini ; ils devraient plutôt être considérés comme des outils pour continuer à approfondir divers sujets pour lesquels beaucoup de zones d'ombre restent à éclaircir.

Au cours de nos recherches, il est évident que la collaboration avec d'autres domaines de la biologie est indispensable, non seulement pour profiter des connaissances acquises et des techniques particulières, mais aussi pour développer de nouvelles techniques et outils bio-informatiques adaptés à nos besoins particuliers.

Cette thèse est structurée autour de travaux qui traitent des méthodes de dosages différentes, mais reliées à une même thématique : la glycosylation. Les techniques analytiques que nous avons appliquées dans notre travail aideront, je l'espère, à la recherche de nouveaux protocoles d'analyses des glycoprotéines. N'oublions pas que l'objectif final de toutes ces analyses est d'apporter une vision globale, afin de pouvoir mieux comprendre les processus biologiques.

## *ANNEXES*

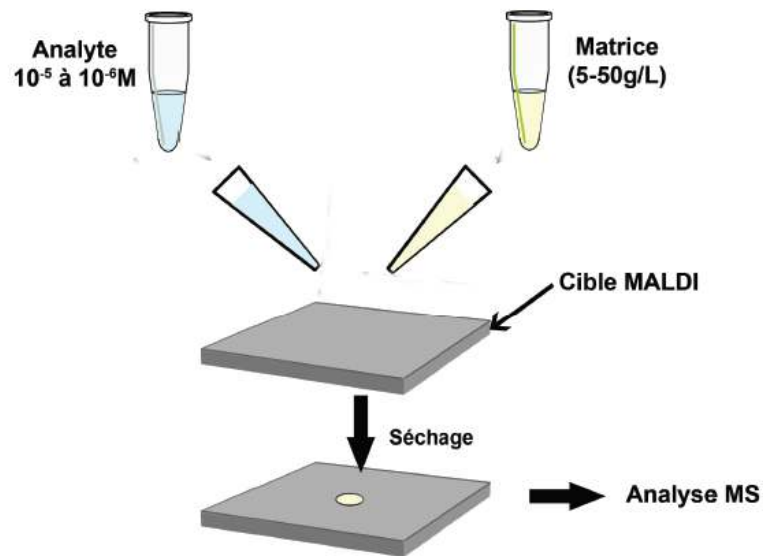
## Annexe 1

Tableau 23 : Les principales sources d'ionisation utilisées dans les analyses de glycomique.

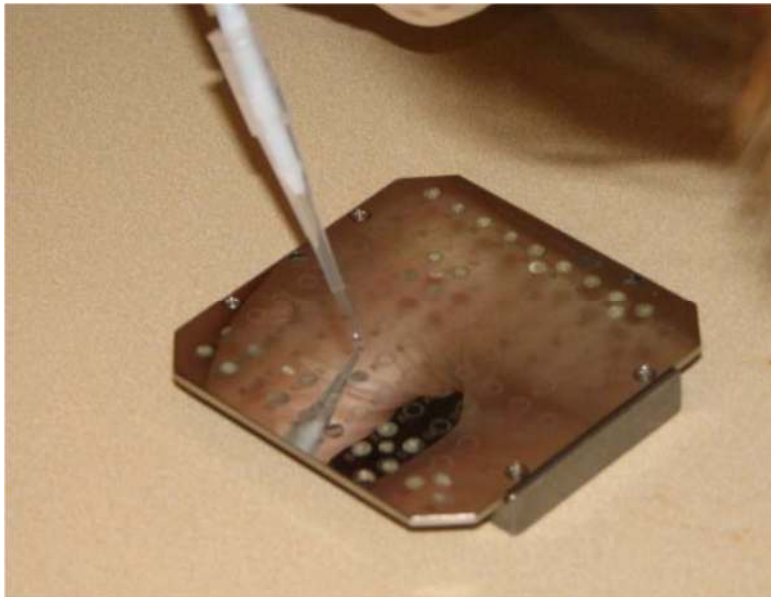
AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>Ionisation des analytes volatiles</b>	
<b><i>Ionisation par impact électronique (EI)</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ionisation des molécules strictement volatiles</li> <li>- Spectres de masse reproductibles</li> <li>- Informations structurales par la fragmentation induite par impact électronique</li> <li>- Sensibilité importante (fmole)</li> <li>- Possibilité de constituer une librairie pour l'identification des analytes</li> <li>- Couplage possible avec la GC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillons obligatoirement volatiles et thermostables</li> <li>- Ionisation limitée aux molécules de masse &lt; 1,2 kDa</li> <li>- Absence d'ions moléculaires</li> </ul>
<b><i>Ionisation chimique (CI)</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ionisation des molécules strictement volatiles</li> <li>- Spectres de masse simples</li> <li>- Spectres d'ions moléculaires</li> <li>- Sensibilité importante (qq fmoles)</li> <li>- Couplage possible avec la GC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillons obligatoirement volatiles et thermostables</li> <li>- Ionisation de molécules de masse &lt; 1,2 kDa</li> <li>- Pas d'informations structurales</li> <li>- Absence de librairies pour l'identification des analytes</li> </ul>
<b>Ionisation des analytes non volatiles</b>	
<b><i>Ionisation par « electrospray » (ESI)</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ionisation de molécules de masses &lt; 250 kDa</li> <li>- Sensible (qq pmoles)</li> <li>- Méthode d'ionisation très douce</li> <li>- Possibilité d'ionisation de complexes non-covalents</li> <li>- Couplage possible avec l'HPLC (Débit : 1-2000 <math>\mu</math>L/min)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation d'espèces multichargées compliquant les spectres de masse</li> <li>- Faible tolérance aux sels/contaminants</li> </ul>
<b><i>Ionisation par nano-ESI</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Efficacité d'ionisation 500 fois plus élevée</li> <li>- Sensibilité importante (qq fmoles)</li> <li>- Couplage possible avec la nano-HPLC (Débit : 10-1000 nL/min)</li> <li>- Meilleure tolérance aux sels/contaminants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fragilité du capillaire</li> <li>- Utilisation d'un nouveau capillaire pour chaque analyse</li> </ul>
<b><i>Ionisation par « matrix-assisted laser desorption /ionization » (MALDI)</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très grande sensibilité (qq amoles à qq fmoles)</li> <li>- Ionisation de molécules de masse &lt; 500 kDa</li> <li>- Excellente tolérance aux sels/contaminants</li> <li>- Automatisable/analyses rapides et à haut débit</li> <li>- Analyses de mélanges complexes</li> <li>- Fragmentation haute énergie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couplage LC-MS impossible (off-line)</li> <li>- Interférence par la matrice</li> <li>- Fragmentation en source des ions analytes</li> </ul>

**Tableau 24 :** Les principaux analyseurs utilisés dans les analyses de glycomique.

	ANALYSEURS SPATIAUX		ANALYSEURS TEMPORELS	
	Quadrupole (Q)	Temps de vol (TOF)	Trappe ionique quadrupolaire (IT)	Résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICR)
Faisceau d'ions	Continu	Pulsé	Pulsé	Pulsé
Principe de la séparation	Séparation des ions selon la stabilité des trajectoires dans un champ quadrupolaire linéaire de radio-fréquence	Dispersion temporelle d'un faisceau ionique pulsé suivie d'une séparation selon le temps de vol	Ions piégés. Séparation des ions selon la stabilité des trajectoires dans un champ quadrupolaire tridimensionnel (ou linéaire) de radio-fréquence	Ions piégés. Séparation des ions selon la fréquence cyclotronique (force de Lorenz) dans un champ magnétique
$m/z$	$k(V/\omega^2 r^2)$	$(2t^2V)/L^2$	$k(V/\omega^2 r^2)$	$B/2\pi\omega$
Résolution	$> 10^3$	$> 10^3$ (mode linéaire) $> 10^4$ (mode réflectron)	$> 10^3$	$> 10^6$
Avantages	-Très adapté pour le couplage à une source ESI	-Gamme de masse très large -Balayage des ions très rapide -Couplage avec une source MALDI excellente	Possibilité de réaliser des expériences MS <sup>n</sup> (n = 2-6)	-Possibilité de réaliser des expériences MS <sup>4</sup> -Très haute résolution
Inconvénients	Limite supérieure en masse faible (4 kDa)	Nécessite l'emploi d'une source d'ionisation pulsée (MALDI)	Gamme de masse limitée	-Champs magnétiques très élevés -Encombrant
V = tension accélératrice, B = intensité du champ magnétique, r = rayon, t = temps, L = longueur du tube TOF, $\omega$ = fréquence				



**Figure 53:** Schema du dépôt de la matrice « *Dried-droplet method* ».



**Figure 54:** Photographie d'une cible MALDI (Applied Biosystems). La cible est une plaque métallique, en acier inoxydable. Celle présentée sur la photographie peut supporter jusqu'à 100 dépôts différents et mesure 5 cm x 5cm.



## **Protocole d'analyse des intégrines $\alpha 3\beta 1$ par spectrométrie de masse MALDI-TOF<sup>[278 ;277]</sup>**

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans RPMI 1640 (Sigma) contenant le sérum de Veau fœtal (Boehringer) inactivé par chaleur à 10%. Les antibiotiques (100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine) La culture cellulaire est réalisé en monocouche dans 95% air/ 5%CO<sub>2</sub> à 37 °C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> humidifié. Après la formation de couches confluentes observées par microscope les cellules ont été lavées deux fois et solubilisé et recueillis dans une solution tampon de phosphates saline. Les amas de cellules ont été homogénéisés dans une solution HCL-Tris a 50mM (pH 7.4) contenant (15mM de NaCl, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de MnCl<sub>2</sub>) et un mélange d'inhibiteur de protéase (Sigma P-2714).

Après les cellules des amas cellulaires ont été lysés par sonication (cinq fois, 5 s chacune) (Sonies, Vibra-Cellule), et incubation pendant 1 h dans de la glace avec le même tampon en plus de 30mM octyles-β-D-Glucopyranoside dans 3% de sulfate de protamine. Les extraits de cellules ont été extraient par centrifugation à 15.000g pendant 1 h (L7-65, Beckman).

### **Chromatographie d'affinité**

La purification de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a été réalisée sur une colonne de Sépharose peptide GD6. Ce dernier est un peptide formé des résidus 3011-3032 du domaine globulaire de la chaîne de la laminine A<sup>[336]</sup>. La préparation de la colonne de purification des intégrines a été réalisée selon le protocole du constructeur (Sigma Aldrich). 10 mg du peptide GD6 a été dissous dans 0.5 ml de tampon de fixation (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.0), puis on dépose 3 ml de ce produit avec un gèle réactifs de fixation et ont les déposent dans un agitateur doux durant toute une nuit à une température de 4 °C.

Les peptides GD6 non fixé et le tampon de fixation ont était éliminé de plus que les groupements réactifs du gèle qui ont étaient bloqué par un tampon Tris/HCL (0.1 M, pH 8.0) pendant 1 H. Après le produit obtenus est lavé alternativement avec des solutions tampons à pH élevées et faible quatre fois. Le gèle réactif peptideGD6-Sépharose est mis dans des colonnes et stockés dans un tampon d'extraction en présence d'agent bactériostatique a 4-8 °C.

5 mg de protéines des extraits cellulaires récupérés de la culture cellulaire a été chargé dans la colonne contenant peptideGD6-Sépharose pour permettre sont interaction avec le ligand immobilisé peptideGD6 durant toute une nuit à 4 °C et le substrat retenu a été élué avec une solution de 20 mM EDTA contenu un tampon de 50mM HCL-Tris a (pH 7.4) et 30mM octyles-β-D-glucoyranoside.

La colonne a été ultérieurement élué avec 0.5 et 1 M NaCl pour enlever toutes autres protéines fixées. Les fractions éluées avec de l'EDTA et le NaCl (10 ml chacune) ont été collecte, dialysés contre l'eau et concentrés à 0.5 ml par lyophilisation. Afin d'éliminé les détergents de l'échantillon, un gèle réactif SM-2 (Bio-Rad) a été utilisé. L'échantillon a été mélangé au gèle et équilibré avec

10mM Tris/HCl, pH 7.4 (1 g de gèle réactif pour 0.07 g de détergent), lavé avec le tampon ci-dessus et des fractions de 1ml ont été collectés, concentrés à 0.5 ml par speed Vác VIVA SPIN 50 et analysé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices et exploré avec des anticorps spécifiques.

### **Électrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunodetection des sous-unités $\alpha 3$ et de $\beta 1$**

Pour la déglycosylation des sous-unités des intégrines  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  avant électrophorèse sur gel SDS-PAGE, 3 mg du produit élué de la colonne de Sépharose-GD6 ont été dénaturé par chauffage à 100 °C durant 2 mn dans 5 ml de solution tampon (20mM de phosphate de sodium, pH 7.5, contenant 50mM de l'EDTA, 0.5% SDS et 5% mercaptoéthanol). Après refroidissement, 1 ml de détergent non ionique à 10% (Nonidet P40) suivi de 0.35 U de peptide N-glycosidase F (PNGase-F) (Boehringer) a été ajoutés et la solution est incubée à 37 °C durant toute une nuit.

Des produits élués du GD6-Sepharose avant et après déglycosylation ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 8% dans des conditions non-réductrice, et transférés sur une membrane de PVDF, par fixation sur le gel électrophorétique durant 1 h à 100 V.

Le rendement du transfert de protéine était au moins de 95% confirmé par coloration sur gel au bleu de Coomassie Bleu R-250. Les protéines immobilisées sur les membranes PVDF ont été coloré avec le rouge Ponceau S suivi d'une décoloration dans H<sub>2</sub>O. Les taches ont été stabilisés dans un tampon TBS/Tween (de 0.02M HCL-Tris, pH 7.6, contenant 0.15M NaCl et 0.1% Tween 20), avec 1% BSA. Après, les membranes ont été séquentiellement incubées avec des anticorps spécifiques dilués dans le tampon TBS/Tween avec 1% BSA (1 : 1000 pour les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$ ) durant 2h et 18 h, respectivement.

Des Anticorps monoclonaux de la sous-unité d'intégrine  $\beta 1$  humaine (clone de souris B3B11 Chemicon), et les anticorps polyclonaux de la sous-unité  $\alpha 3$  humaine (Chemicon) ont été utilisés. Après un triple lavage avec TBS/Tween, les membranes ont été incubées avec le reactif contenant la phosphatase-alkaline couplé aux IgG (Boehringer) (1 : 500 dans TBS/Tween avec 1% BSA) durant 1 h et les bandes ont été visualisées par coloration avec le 4 bleu-nitrotetrazolium de chlorure comme substrat.

### **Analyse des chaînes des Glycannes**

Différentes bandes d'électrophorèse de protéine correspondant aux sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 1$  ont été excisées de la membrane de PVDF.

### **Réduction et alkylation des sous unité des intégrines**

Les fragments excisés de membrane de PVDF ont été mises dans des tubes d'Eppendorf et deux fois lavées avec 1ml de 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0, pour 15 mn chacune. Le résidu du lavage est jeté puis on ajoute le dithiothreitol pour permettre la réduction de la protéine à 60 °C pendant 30 mn. Après refroidissement à la température ambiante, 20 ml de 100mM d'iodoacétamide sont ajoutés et la

protéine a été alkylé durant 30mn à la température ambiante en absence de la lumière. Les réactifs de réduction et d'alkylation, ainsi que le SDS résiduel ont été éliminés par incubation dans 1v/1v acétonitrile/20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0, durant 60 H. ultérieurement, les fragments de membrane sont stockés dans une solution de conservation (Boehringer).

### **Digestions par les Glycosidases**

L'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  (GD6-Sepharose pure) a été diluée dans une solution tampon appropriée et traitée avec 0.5mU PNGase F dans 10ml de 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5) ou avec 10mU de neuraminidase dans 9 ml de Tris-HCL de 10mM (pH 6.5) contenant du NaCl a 150mM à 37°C durant 18 H. Comme contrôle, un équivalent de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  a été incubé en l'absence de l'enzyme. Après l'incubation la solution tampon de neuraminidase a été réajustée à pH 7.4 par dilution avec 1% BSA dans la solution tampon de TBS/EDTA (10mM de Tris-HCL, pH 8.0, contenant 150mM de NaCl, 10mM de EDTA).

### **Extraction des sucres**

Après déglycosylation, la solution tampon d'incubation était complètement sèche dans un SpeedVacs puis le résidu est dissous dans 10 ml d'eau ultrapure (Milli-Q plus, millipore, Bedford, CA, Etats-Unis) pour l'appliquer à l'élution de la microcolonne.

### **Elution des sucres**

Avant l'analyse par MS MALDI, une microcolonne se composant d'une pipette d'Eppendorf GEloader avec une micropipette on ajoute 5 ml de chacun des gels AG-3 (OH<sup>-</sup> en bas) et AG-50 (H<sup>+</sup> au sommet) a été utilisée. La microcolonne est lavée avec 100 ml d'eau et l'échantillon des sucres ont été élués avec 100 ml de l'eau, aliquotes et séchés par SpeedVac.

### **Spectrométrie de masse MALDI MS**

Des spectres de masse MALDI MS ont été enregistrés en utilisant un Spectromètre de masse Voyager DE-PRO MALDI-TOF (Applied Biosystème) équipé de l'extraction retardée et opérant en mode réflecteur. Les matrices de MALDI ont été préparées en dissolvant 25 mg de l'acide 2.5 dihydroxybenzoïque (DHB) dans 1 ml d'acide trifluoroacétique de l'acétonitrile 0.2% (70 : 30 v/v). 1  $\mu$ L de la matrice est déposé sur la plaque métallique sur lequel on lui ajoute 1 $\mu$ l de l'analyte.

Les tensions d'accélération et le mode réflecteur ont été programmé comme suite : fixation de la tension à 20 kilovolts, la première grille de la cible des tirs laser est à 95% de tension applicable, l'extraction retardée à 600 ns pour obtenir les meilleurs scores signal/bruit de fond et la meilleure résolution isotopique avec l'étalonnage externe multipoint utilisant un mélange de peptide des calibrant Applied biosystèmes. Chaque spectre représente la somme de 1500 tirs laser sur des zones aléatoirement déterminé selon la position de l'échantillon. Les valeurs brutes ont été analysées en utilisant le logiciel fourni par les constructeurs et sont enregistrés comme des masses monoisotopiques.

L'étalonnage de masse réalisé avec l'ion MH<sup>+</sup> de l'insuline positionné à m/z 5734.6 et un ion connu de peptide à m/z 1209.7. Les données ont été analysées et exprimées par les moyennes des masses.

### **Spectrométrie de masse**

*MALDI TOF* : Spectromètre de masse Voyager Elite (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) équipé d'une cellule de collision et d'une extraction retardée, tube de vol 2 m en mode linéaire, laser à azote 337 nm, impulsion de largeur 3 ns, de fréquence 20 Hz. Les acquisitions sont des moyennes d'au moins 100 tirs laser.

- Analyse MS mode réflectron négatif : tension d'accélération 20 kV, tension de grille 15 kV, tension de guide d'ion 20 V, retard à l'extraction 200 ns, pression de source 10<sup>-7</sup> mbar.
- Analyse PSD mode négatif : tension d'accélération 25 kV, tension de grille 14 kV, tension de guide d'ion variable, retard à l'extraction 100 ns, pression de source 10<sup>-7</sup> mbar.
- Analyse PSD et CID/PSD mode positif : tension d'accélération 20 kV, tension de grille 13 kV, tension de guide d'ion variable, retard à l'extraction 350 ns (chute de la résolution à R50=1000), pression de source 10<sup>-7</sup> mbar (PSD) et 10<sup>-6</sup> mbar (CID argon).

### **Analyse des intégrines par ELISA**

3 mg/puits du produit d'élution par GD6 (traité par neuraminidase, traité ou non par PNGase F ont été dilués dans 1% BSA dans une solution tampon de TBS/Mg et déposés dans des puits des plaques ELISA contenant laminine, Collagène VI, et fibronectine puis incubés durant 1 h à 37 °C. Les puits ont été rincés trois fois avec la solution tampon de TBS/ EDTA (pour les fixations non spécifique). Les anticorps polyclonaux anti- $\alpha 3$  et anti $\beta 1$  (Chemicon) ont été ajoutés ultérieurement dans les puits (dilués à 1 : 1000 dans 1% BSA dans une solution tampon de TBS/EDTA), et les échantillons ont été incubés durant 90 mn à 37 °C. Après les puits ont été lavés trois fois avec la solution tampons de TBS/EDTA, les anticorps IgG couplé à la phosphatase alcaline et dilué à 1:1000 dans 1% BSA dans une solution tampons de TBS/EDTA ont été appliqués durant 1 H. Après trois lavages avec la solution tampon TBS/EDTA, après la coloration a été développée en ajoutant le pNpp (Sigma) et l'absorbance a été mesurée à 405 nanomètre après 18 h d'incubation.

Les DO pour les fixations non spécifiques mesurées en présence 10 mM de l'EDTA étaient soustraits de la réaction totale pour avoir les valeurs de la réaction spécifique de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  aux ligands immobilisés. Chaque mesure a été déterminée en triple et reproduit trois fois.

**Tableau 25 :** Masses des glycanes des sous unités  $\alpha 3\beta 1$  des lignés cellulaires épithéliales urétérale humaines HCV29 obtenus par spectrométrie MALDI TOF. (d'après Anna Lityńska, Ewa Pocheć, Dorota Hoja-lukowicz, El bieta Kremser, Piotr Laidler, Angela Amoresano, and Chiara Monti, the structure of the oligosaccharides of integrin from human ureter epithelium (HCV29) cell line *Acta Biochim Polon.*; 49: 491–500.)

**Sous unite  $\beta 1$**

Peak	Mass	Structures observés
1	1419.9	Hex6HexNAc2
2	1502.2	Hex4HexNAc4
3	1580.1	Hex7HexNAc2
4	1663.8	Hex5HexNAc4
5	1743.8	Hex8HexNAc2
6	1809.2	Hex5HexNAc4Fuc
7	1905.5	Hex4HexNAc6
8	1975.6 (MNa2+ )	Hex5HexNAc4Sia
9	2122.1 (MNa2+ )	Hex5HexNAc4FucSia
10	2174.7	Hex6HexNAc5Fuc
11	2485.3 (MNa2+)	Hex6HexNAc5FucSia
12	2540.2	Hex7HexNAc6Fuc
13	2787.6	Hex8HexNAc5FucSia
14	2852.8 (MNa2+)	Hex7HexNAc6FucSia
15	3168.7 (MNa3+)	Hex7HexNAc6FucSia2

**Sous unité  $\alpha 3$** 

<b>Peak</b>	<b>Mass</b>	<b>Structures observés</b>
1	1503.7	Hex4HexNAc4
2	1743.7	Hex8HexNAc2
3	1809.2	Hex5HexNAc4Fuc
4	1905.5	Hex4HexNAc6
5	1975.5 (MNa+)	Hex5HexNAc4Sia
6	2028.2	Hex6HexNAc5
7	2122.1 (MNa+)	Hex5HexNAc4FucSia
8	2174.7	Hex6HexNAc5Fuc
9	2487.5 (MNa+)	Hex6HexNAc5FucSia
10	2539.7	Hex7HexNAc6Fuc
11	2642.3	Hex6HexNAc8
12	2852.1 (MNa+)	Hex7HexNAc6FucSia
13	2903.5	Hex8HexNAc7Fuc

## Annexe 2

### Quelques définitions en spectrométrie de masse

**Dalton** unité de masse moléculaire, défini comme un douzième de la masse d'un atome de carbone  $^{12}\text{C}$  ( $1,66 \cdot 10^{-24}$  g), approximativement égal à la masse d'un atome  $^1\text{H}$ .

**Gamme de masse** Ce sont les rapports masse/charge ( $m/z$ ) minimum/maximum détectables avec le spectromètre de masse. Elle est fonction des caractéristiques technologiques de l'analyseur.

**Ion moléculaire** L'ion moléculaire est utilisé pour désigner la molécule intacte ionisée. Cependant ce terme est aussi utilisé pour désigner les formes ioniques à nombre impair d'électrons, comme le radical cation  $\text{M}^+$  et le radical anion  $\text{M}^-$ . Les ions formés en ESI et en MALDI sont souvent des espèces à nombre pair d'électrons comme  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ou  $[\text{M}-\text{H}]^-$  et sont appelés ions protonés ou déprotonés, ou parfois ions pseudo-moléculaires (ceci est également le cas avec les modes d'ionisation FAB, LSIMS, etc.).

**Masse moyenne** La masse moyenne d'une molécule est calculée en utilisant les masses atomiques moyennes des éléments individuels la constituant ( $\text{C}=12,011$  ;  $\text{H}=1,008$  ;  $\text{N}=14,007$  ;  $\text{O}=15,999$  ; etc.). C'est le centroïde de la distribution isotopique.

**Masse monoisotopique** La masse monoisotopique d'une molécule est calculée en utilisant la masse de l'isotope le plus abondant des éléments individuels la constituant ( $\text{C}=12,00000$  ;  $\text{H}=1,007825$  ;  $\text{O}=15,9949$  ; etc.).

**Mole** une mole équivaut à  $6,02 \cdot 10^{23}$  molécules. (1 nanomole= $10^{-9}$  mol ; 1 picomole= $10^{-12}$  mol ; 1 femtomole= $10^{-15}$  mol, 1 attomole= $10^{-18}$  mol ; 1 zeptomole= $10^{-21}$  mol)

**Précision en masse** La précision de masse et les facteurs d'erreurs sont importants. Il faut distinguer les erreurs de détermination propre de  $m/z$  et les ambiguïtés dues au processus d'ionisation.

*Erreur de détermination de  $m/z$*  : erreur systématique (erreur théorique, erreur instrumentale de calibration, erreur de l'opérateur) La précision peut être évaluée avec l'écart type de la moyenne après des mesures successives. L'indication d'un écart type ne signifie pas que la valeur vraie est dans l'intervalle défini, mais indique le degré de hasard de la mesure. Les erreurs systématiques doivent être mesurées avec un composé de masse connue. Lorsqu'un seul spectre peut être obtenu sur un échantillon biologique en faible quantité, l'écart type peut être évalué en déterminant la masse à chaque acquisition (10 acquisitions par exemple), et la moyenne peut donner la masse moléculaire avec son écart type. Si le système d'acquisition donne directement la moyenne des 10 acquisitions, il ne donne pas la mesure de l'écart type. Bien sûr, les moyennes sont identiques, mais la première méthode est plus informative.

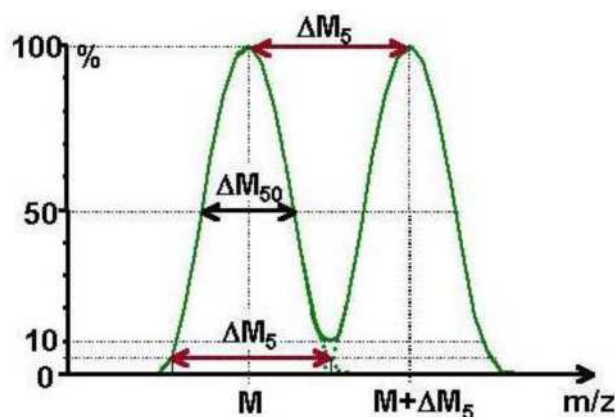
*Perte de précision provoquée pendant le processus d'ionisation* : erreur accidentelle (fragmentation, agrégation, modification structurale, présence d'adduits) Dans la plupart des cas, ces

ambiguïtés sont mises en évidence expérimentalement, avec des mesures sur des composés connus. Un appareil précis peut donner un ordre de précision de masse indépendamment de la résolution en masse pour un échantillon contenant un unique composé. Un faible pouvoir de résolution est compatible avec une précision de mesure de masse importante. Il faut toutefois remarquer qu'en MALDI les adduits de protéines sont une source d'élargissement des pics. Ils dépendent de la nature de la protéine elle-même. La calibration n'est pas toujours possible car les adduits ne peuvent pas toujours être résolus. C'est un exemple de perte de précision par manque de résolution.

**Résolution** On peut distinguer pouvoir de résolution en masse et résolution de masse. Ils désignent tous deux le pouvoir séparateur du spectromètre de masse pour deux ions de masses voisines  $M$  et  $M + \Delta M_x$ , tels que leurs deux pics adjacents dans un spectre de masse ont même taille et même profil (Gaussien, Lorentzien ou triangulaire) avec un taux de superposition donné (10% de vallée par rapport à la ligne de base, largeur de pic à mi-hauteur, etc.) noté par l'indice  $x$ .

**Résolution de masse** C'est la différence de masse (ou plutôt de rapport  $m/z$ ),  $\Delta M_x$  qui sépare deux pics adjacents de masses  $M$  et  $M + \Delta M_x$ .

**Pouvoir de résolution en masse** nombre sans dimension  $R = M / \Delta M_x$  (ou  $\Delta M_x / M$  selon les auteurs...). Le pouvoir de résolution à 10% de vallée peut aussi être calculé avec un seul pic, en faisant l'approximation que la largeur à 5% de hauteur d'un seul pic est égale à la distance des sommets de deux pics séparés par une vallée à 10% de hauteur. Cette valeur est appelée pouvoir de résolution théorique. Dans ce cas, le calcul ne tient pas compte des problèmes de différence de profil des pics (Figure : 60).



**Figure 55 :** Calcul de la résolution.

Une autre définition standard utilise la largeur de pic  $\Delta M_{50}$ , c'est-à-dire la largeur du pic à mi-hauteur (notée parfois FWHM pour Full Width at Half Maximum height).

**Sensibilité** C'est la quantité minimale de produit nécessaire pour avoir un signal sur un spectre de masse avec un rapport signal/bruit donné. La sensibilité absolue d'un appareil est mesurée en C/mg de produit.



**Tableau 26** : Masses des résidus des monosaccharides.

Monosaccharide	Residue Formula	Residue Mass <sup>a,b</sup>
Pentose	$C_5H_8O_4$	132.042
		132.116
Deoxyhexose	$C_6H_{10}O_4$	146.078
		146.143
Hexose	$C_6H_{10}O_5$	162.053
		162.142
Hexosamine	$C_6H_{11}NO_4$	161.069
		161.157
HexNAc	$C_8H_{13}NO_5$	203.079
		203.179
Hexuronic acid	$C_6H_8O_6$	176.032
		176.126
<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	$C_{11}H_{17}NO_8$	291.095
		291.258
<i>N</i> -Glycolylneuraminic acid	$C_{11}H_{17}NO_9$	307.090
		307.257

<sup>a</sup>Top figure represents monoisotopic mass (based on C = 12.000000, H = 1.007825, N = 14.003074, O = 15.994915), bottom figure represents average mass (based on C = 12.011, H = 1.00794, N = 14.0067, O = 15.9994).

<sup>b</sup>The masses of the intact glycans can be obtained by addition of the residue masses given above, plus the mass of the terminal group (H<sub>2</sub>O for an unmodified glycan) 18.011 (monoisotopic) and 18.152 (average) and the mass of any reducing terminal or other derivative.

## Annexe 3

### 3.1 Dosage des mucoprotéines selon Winzler<sup>[257]</sup> modifié :

0.5 ml de sérum est ajouté à 4.5 ml à une solution saline à 0.85%, puis 2.5ml de 1.8M d'acide perchlorique sont ajoutés au mélange goutte-à-goutte sous agitation douce. Après dix minutes le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre N 50 de Whatman, ensuite 1 ml de l'acide phosphotungstique à 5% est ajouté à 5 ml du filtrat. Après avoir bien mélangé et laisser reposer pendant 10 minutes on centrifuge le filtrat à 2000 t/mn pendant 10 minutes, après décantation le précipité est lavé avec de l'acide perchlorique à 0.6M. Le surnageant est jeté et le précipité est dissous dans une solution de carbonate de sodium à 20%. Dans 3.5 ml on ajoute 0.5 ml du réactif Foline-Ciocalteu. Le mélange est placé dans un bain-marie à 37° C pendant 15 minutes et lu à 680 nm. En même temps un étalon est préparé en prenant 0.5 ml de solution de tyrosine dans 1 ml de carbonate de sodium à 20%, plus 3.0 ml d'eau distillée et 0.5 ml du réactif de foline- Ciocalteu. La lecture pour les deux est réalisée à 680 nm contre un blanc constitué de 3.5 ml de l'eau plus de 1.0 ml de carbonate de sodium à 20% et de 0.5 ml du réactif de foline- Ciocalteu.

Puisque 100 mg de mucoprotéines contiennent 4.2 mg de tyrosine, le résultat de dosage de tyrosine obtenu est converti en mucoprotéines grâce à un facteur de 23.8;

Ainsi 1 Mg mucoprotéine par 100ml de sérum

= lecture de l'échantillon / lecture de standard x 100/0.33 x 0.05 x 23.8

= lecture de l'échantillon / lecture de standard x 357.

### 3.2 Dosage du Fucose selon Dische et Shettles<sup>[265]</sup> :

Elle consiste à faire réagir le produit de la dissolution des protéines du sérum précipité par l'utilisation de l'éthanol à 95% dans une solution alcaline avec de l'acide sulfurique pendant 3-10 mn suivi par l'addition de la cystéine. Les dosages sont réalisés par la détermination des densités optiques à deux longueurs d'onde différentes afin d'éliminer les densités optiques obtenues par les autres sucres.

Après précipitation des protéines sériques avec l'alcool éthylique à 95%, le surnageant contient le fucose libre. La mesure de la concentration de fucose dans la fraction soluble a été réalisée comme suit : 0.05 ml d'acide perchlorique à 70% est ajouté à 0.50 ml de sérum. Le mélange est fortement agité, refroidi pendant 30 minutes et centrifugé. Une partie (0.1 ml) du surnageant est mélangée à 0.90 ml de NaOH à 0.1N. L'acide sulfurique et la cystéine concentrés sont ajoutés à cette solution comme décrit dans la technique.

Le résultat est exprimé en mg de fucose dans 100 ml de sérum. Obtenu en multipliant la formule utilisée pour estimer le fucose total selon Winzler<sup>[257]</sup> par 1.1.

### 3.3 Dosage des acides sialiques libres par la méthode de Warren <sup>[339]</sup>.

Réactifs :

A : dissoudre 4,278 g de métaperiodate de sodium dans 4 ml d'eau distillée, ajouter 58 ml d'acide phosphorique concentré et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

B : solution contenant 10 g d'arsénite de sodium et 7,1 g de sulfate de sodium pour 10 ml d'acide sulfurique 0,1 N.

C : solution contenant 0,6 g d'acide thiobarbiturique et 7,1 g de sulfate de sodium pour 100 ml d'eau distillée. Le réactif est stable pendant 1 mois à 4°C et à l'obscurité.

D : cyclohexanone redistillée.

Mode opératoire :

Hydrolyse des liaisons sialosyl : L'hydrolyse des liaisons sialosyl est réalisée soit par l'acide formique, soit par l'acide trifluoroacétique à pH 1,5 et à 80 °C pendant 30 à 60 min dans les deux cas. Après évaporation ou lyophilisation, le résidu sec est dissous dans une quantité déterminée d'eau distillée.

Développement de la coloration : Introduire dans des tubes à essais :

1. 0,2 ml de la solution contenant 1 à 10 mg d'acide sialique et 0,1 ml du réactif A.
2. Maintenir à la température de la pièce pendant 20 min.
3. Éliminer l'excès de periodate en ajoutant 1 ml de réactif B.
4. Après 5 min de repos à température ambiante, ajouter 3 ml de réactif C et placer les tubes obturés avec une bille de verre pendant 15 min au bain-marie bouillant.
5. Refroidir et extraire la coloration par agitation vigoureuse en présence de 3 ml de réactif D.
6. La phase colorée est séparée par centrifugation et les mesures d'absorbance sont effectuées à 549 nm. La coloration est stable pendant plusieurs heures à l'obscurité.
7. Courbe d'étalonnage 0,5mg et 25 mg d'acide sialique pour un volume final de 3 ml de cyclohexanone.

## Annexe 4

Tableau 27 : Les différents types de glycosylation des protéines des mammifères.

Liaison peptide/sucre		Glycoprotéines
N-GlcNAc	(NeuAc, Fuc, Gal, GlcNAc, Man)GlcNAc(β1-N)Asn-Xxx-Ser/Thr	50% des glycoprotéines totales 80% des glycoprotéines membranaires
O-GalNAc	(NeuAc, Gal, GlcNAc)GalNAc(α1-O)Ser/Thr	Mucines membranaires et des sécrétions épithéliales exocrines La plupart des glycoprotéines membranaires Glycoprotéines circulantes
O-GlcNAc	GlcNAc(β1-O)Ser/Thr	Protéines cytosoliques et nucléaires
O-Gal	+/- Glc(α1-2)Gal(β1-O)Ser/Thr	Collagènes
O-Xyl	[HexUA-HexNAc] <sub>n</sub> -GlcUA-Gal-Gal-Xyl(β1-O)Ser/Thr	Protéoglycannes matriciels, membranaires & circulants
O-Man	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-O)Ser/Thr SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (3)GlcUA(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-O)Ser/Thr  Man(α1-O)Ser/Thr	Glycoprotéines musculaires Glycoprotéines cérébrales  IgG 2 (Chaîne légère)
O-Fuc	+/- [NeuAc(α2-3/6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Fuc(α1-O)Ser/Thr Glc(β1-3)Fuc(α1-O)Ser/Thr	Domaines EGF/ Domaines TSR des - facteurs de coagulation - Récepteurs Notch
O-Glc	+/- Xyl(α1-3) +/- Xyl(α1-3) +/- Glc(β1-O)Ser/Thr  [Glc(α1-4)] <sub>n</sub> Glc(α1-O)Tyr	Domaines EGF des - facteurs de coagulation - Récepteurs Notch  Glycogénine
C-Man	Man(α1-C)Trp-Xxx-Xxx-Trp	RNase 2, IL-12 Domaines TSR de quelques protéines comme certains facteurs du complément et la thrombospondine 1

**Tableau 28 :** Liste des différentes glycosyltransférases.

---

**1. Glycosyltransferases assembling N-glycans:**

---

*Oligosaccharyl-transferase*, Dolichol-diphospho-oligosaccharide protein oligosaccharyltransferase E.C.2.4.1.119;  
*GlcNAc-1-phospho-transferase*, UDP-GlcNAc: dolichyl-phosphate GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.15;  
 *$\beta$ 4-Man-transferase*, Chitobiosyldiphosphodolichol  $\beta$ -mannosyltransferase, E.C. 2.4.1.142;  
*Dol-P Man synthase*, Dolichyl-phosphate  $\beta$ -mannosyltransferase, E.C. 2.4.1.83;  
*Dol-P-Glc synthase*, Dolichyl-phosphate  $\beta$ -glucosyltransferase, E.C. 2.4.1.117;  
*lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase*, UDP-GlcNAc: lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase, E.C. 2.7.8.17  
*GlcNAc-transferase I*, UDP-GlcNAc: Man $\alpha$ 1-3-R (GlcNAc to Man $\alpha$ 1-3)  $\beta$ 1,2-GlcNAc-transferase I, E.C. 2.4.1.101;  
*GlcNAc-transferase II*, UDP-GlcNAc: Man $\alpha$ 1-6-R (GlcNAc to Man $\alpha$ 1-6)  $\beta$ 1,2-GlcNAc-transferase II, E.C. 2.4.1.143;  
*GlcNAc-transferase III*, UDP-GlcNAc: R<sub>1</sub>-Man $\beta$ 1-4-R<sub>2</sub> (GlcNAc to Man $\beta$ 1-4)  $\beta$ 1,4-GlcNAc-transferase III, E.C.2.4.1.144;  
*GlcNAc-transferase IV*, UDP-GlcNAc: R<sub>1</sub>-Man $\alpha$ 1-3-R<sub>2</sub> (GlcNAc to Man $\alpha$ 1-3)  $\beta$ 1,4-GlcNAc-transferase IV, E.C.2.4.1.145;  
*GlcNAc-transferase V*, UDP-GlcNAc: R<sub>1</sub>-Man $\alpha$ 1-6-R<sub>2</sub> (GlcNAc to Man $\alpha$ 1-6)  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase V;  
*GlcNAc-transferase VI*, UDP-GlcNAc: R<sub>1</sub>-Man $\alpha$ 1-6-R<sub>2</sub> (GlcNAc to Man $\alpha$ 1-6)  $\beta$ 1,4-GlcNAc-transferase VI;  
 *$\alpha$ 3-sialyltransferase (N)*, CMP-sialic acid: Gal $\beta$ 1-3/4GlcNAc-R (sialic acid to Gal)  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase, E.C.2.4.99.6;  
 *$\alpha$ 6-sialyltransferase (N)*, CMP-sialic acid: Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R (sialic acid to Gal)  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase, E.C.2.4.99.1;  
 *$\alpha$ 6-Fuc-transferase*, GDP-Fuc: R<sub>1</sub>-GlcNAc $\beta$ -Asn-R<sub>2</sub> (Fuc to GlcNAc)  $\alpha$ 1,6-Fuc-transferase, E.C.2.4.1.68.

**2. Glycosyltransferases assembling O-glycans:**

---

*polypeptide  $\alpha$ -GalNAc-transferase*, UDP-GalNAc: polypeptide  $\alpha$ -GalNAc-transferase, E.C.2.4.1.41;  
*core 1  $\beta$ 3-Gal-transferase*, UDP-Gal: GalNAc-R  $\beta$ 1,3-Gal-transferase, E.C.2.4.1.122;  
*core 2  $\beta$ 6-GlcNAc-transferase*, UDP-GlcNAc: Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc)  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.102;  
*core 3  $\beta$ 3-GlcNAc-transferase*, UDP-GlcNAc: GalNAc-R  $\beta$ 1,3-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.147;  
*core 4  $\beta$ 6-GlcNAc-transferase*, UDP-GlcNAc: GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc)  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.148;  
*core 5  $\alpha$ 3-GalNAc-transferase*, UDP-GalNAc: GalNAc-R  $\alpha$ 1,3-GalNAc-transferase;  
*core 6  $\beta$ 6-GlcNAc-transferase*, UDP-GlcNAc: GalNAc-R  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase;  
*elongation  $\beta$ 3-GlcNAc-transferase*, UDP-GlcNAc: Gal $\beta$ 1-3(R<sub>1</sub>)GalNAc-R<sub>2</sub> (GlcNAc to Gal)  $\beta$ 1,3-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.146;  
 *$\alpha$ 3-sialyltransferase (O)*, CMP-sialic acid: Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (sialic acid to Gal)  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase, E.C.2.4.99.4;  
 *$\alpha$ 6-sialyltransferase (O) I*, CMP-sialic acid: R<sub>1</sub>-GalNAc-R<sub>2</sub> (sialic acid to GalNAc)  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase, E.C.2.4.99.3;  
 *$\alpha$ 6-sialyltransferase (O) II*, CMP-sialic acid: sialyl $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (sialic acid to GalNAc)  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase, E.C.2.4.99.7.

---

---

### 3. Glycosyltransferases acting on both N- and O-glycans:

---

*blood group i*  $\beta$ 3-GlcNAc-transferase, UDP-GlcNAc: Gal $\beta$ 1-4-R  $\beta$ 1,3-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.149;  
*blood group I*  $\beta$ 6-GlcNAc-transferase, UDP-GlcNAc: GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4-R (GlcNAc to Gal)  $\beta$ 1,6-GlcNAc-transferase, E.C.2.4.1.150;  
*blood group Cad or S<sup>d</sup>*  $\beta$ 4-GalNAc-transferase, UDP-GalNAc: sialic acid  $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ -R (GalNAc to Gal)  $\beta$ 1,4-GalNAc-transferase;  
*blood group A*  $\alpha$ 3-GalNAc-transferase, UDP-GalNAc: Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ -R (GalNAc to Gal)  $\alpha$ 1,3-GalNAc-transferase, E.C.2.4.1.40;  
*blood group B*  $\alpha$ 3-Gal-transferase, UDP-Gal: Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ -R (Gal to Gal)  $\alpha$ 1,3-Gal-transferase, E.C.2.4.1.37;  
 $\beta$ 4-Gal-transferase, UDP-Gal: GlcNAc-R  $\beta$ 1,4-Gal-transferase, E.C.2.4.1.38;  
 $\beta$ 3-Gal-transferase, UDP-Gal: GlcNAc-R  $\beta$ 1,3-Gal-transferase;  
 $\alpha$ 3-Gal-transferase, UDP-Gal: Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R  $\alpha$ 1,3-Gal-transferase, E.C.2.4.1.124;  
 $\alpha$ 2-Fuc-transferase, GDP-Fuc: Gal $\beta$ -R  $\alpha$ 1,2-Fuc-transferase, E.C.2.4.1.69;  
 $\alpha$ 3-Fuc-transferase, GDP-Fuc: Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -R (Fuc to GlcNAc)  $\alpha$ 1,3-Fuc-transferase, E.C.2.4.1.152;  
 $\alpha$ 3/4-Fuc-transferase, GDP-Fuc: Gal $\beta$ 1-3/4GlcNAc $\beta$ -R (Fuc to GlcNAc)  $\alpha$ 1,3/4-Fuc-transferase, E.C.2.4.1.65;  
 $\alpha$ 6-sialyltransferase, CMP-sialic acid: sialyl $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc-R (sialic acid to GlcNAc)  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase; E.C.2.4.99.1  
 $\alpha$ 8-sialyltransferase, CMP-sialic acid: sialyl $\alpha$ 2-3/8Gal-R (sialic acid to sialic acid)  $\alpha$ 2,8-sialyltransferase, E.C.2.4.99.8.

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473(1):4-8.
- [2] Spiro, R. G. MINI REVIEW Protein glycosylation : nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. 2002. 12(4).
- [3] Dennis, J. W., Nabi, I. R., and Demetriou, M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell*, 2009.39(7) :1229–1241
- [4] Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor–New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [5] Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 1993; 3(2):97-130.
- [6] Pagel O, Loroch S, Sickmann A, Zahedi RP. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteom*. (2015);12(3):235–53.
- [7] Ueda K. Glycoproteomic strategies: From discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers. *Proteom Clin App*. (2013);7(9/10):607–17.
- [8] Holst S, Stavenhagen K, Balog CI, Koeleman CA, McDonnell LM, Mayboroda OA, Verhoeven A, Mesker WE, Tollenaar RA, Deelder AM and Wührer M Investigations on aberrant glycosylation of glycosphingolipids in colorectal cancer tissues using liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Mol Cell Proteomics* (2013) 12:3081-93.
- [9] Alhadeff, J. A. "Malignant cell glycoproteins and glycolipids." *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 1989; 9(1): 37-107.
- [10] Jaeken, J. and H. Carchon. "The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview." *J. Inherit. Metab. Dis*. 1993;16(5): 813-820.
- [11] Russell, D., Oldham, N. J., and Davis, B. G. Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydrate research*, (2009). 344(12) :1508–1514.
- [12] Jankovic, M. Glycans as Biomarkers : Status and Perspectives. *Journal of Medical Biochemistry*, (2011). 30(3) :213–223.
- [13] Roth, J. Protein N -Glycosylation along the Secretory Pathway : Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions. *Chemical Reviews*, 2002.102(2) :285–304.

- [14] Feizi, T. "Progress in deciphering the information content of the "glycome"-a crescendo in the closing years of the millenium." *Glycoconj. J.* 2000; 17: 553-565.
- [15] Bohne, A. and C. W. von der Lieth. "Glycosylation of proteins: a computer based method for the rapid exploration of conformational space of N-glycans." *Pac. Symp. Biocomput.* 2002; 285-296.
- [16] Lamari, F. N., X. M. Gioldassi, et al.. "Structure analysis of lipoglycans and lipoglycan-derived carbohydrates by capillary electrophoresis and mass spectrometry." *Biomed. Chromatogr.* 2002; 16: 116-126.
- [17] Muramatsu, T.. "Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas." *Glycobiology*, 1993; 3(4): 291-296.
- [18] Springer, G. F.. "T and Tn, general carcinoma autoantigens." *Science*, 1984; 224(4654): 1198-11206.
- [19] Kannagi, R. "Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer." *Glycoconj. J.* 1997; 14(5): 577-584.
- [20] Rudd, P. M., T. Elliott, et al. "Glycosylation and the immune system." *Science* 2001; 291(5512): 2370-2376.
- [21] Malhotra, R., M. R. Wormald, et al. (1995). "Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein." *Nat. Med.* 2001; 1(3): 237-243.
- [22] Garred, P., H. O. Madsen, et al. "Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study." *J. Rheumatol.* 2000; 27(1): 26-43.
- [23] Jaeken, J. and H. Carchon. "The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview." *J. Inherit. Metab. Dis.* 1993;16(5): 813-820.
- [24] Duncan, G., C. McCormick, et al. "The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins." *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 511–516.
- [25] Okajima, T., S. Fukumoto, et al. "Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers–Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene." *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 28841–28844.
- [26] Yoshida, A., K. Kobayashi, et al. "Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1." *Dev. Cell* 2001; 1: 717-724.
- [27] Pilatte, Y., J. Bignon, et al. "Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity." *Glycobiology* 1993; 3(3): 201-218.



- [28] Gabius, J. C., H. C. Siebert, et al. "Chemical Biology of the sugar code." *ChemBioChem* 2004; 5: 740-764.
- [29] Yu H, Chen X. Carbohydrate post-glycosylational modifications. *Org Biomol Chem.* 2007; 5(6):865-72.
- [30] Kornfeld R & Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 631-64.
- [31] Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1726(2):121-37.
- [32] Helenius, A. and M. Aebi "Intracellular function of N-linked glycans." *Science* 2001; 291: 2364-2369.
- [33] Hauri, H. P., C. Appenzeller, et al. "Lectins and traffic n the secretory pathway." *FEBS Lett.* 2000; 476: 32-37.
- [34] Kornfeld, S. "Lysosomal enzyme targeting." *Biochem. Soc. Trans.* 1990; 18: 367-374.
- [35] Scheiffele, P., J. Peränen, et al. "N-glycans as apical sorting signal in epithelial cells." *Nature* 1995; 378: 96-98.
- [36] Takahashi, T., R. Honda, et al. "Cloning of the human cDNA which can complement the defect of the yeast mannosyltransferase I-deficient mutant *alg1*." *Glycobiology*, 2000; 10: 321-327.
- [37] Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473(1):67-95.
- [38] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007; 446(7139):1017-22.
- [39] Bulöw HE, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22:375-407.
- [40] Spiro RG. Glycoproteins. *Adv Protein Chem.* 1973; 27:349-467.
- [41] Martinez T, Pace D, Brady L, Gerhart M, Balland A. Characterization of a novel modification on IgG2 light chain. Evidence for the presence of O-linked mannosylation. *J Chromatogr A.* 2007; 1156(1-2):183-7.
- [42] Rampal R, Luther KB, Haltiwanger RS. Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. *Curr Mol Med.* 2007; 7(4):427-45.
- [43] Shao L, Luo Y, Moloney DJ, Haltiwanger R. O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O glucosyltransferase. *Glycobiology.* 2002; 12(11):763-70.

- [44] de Beer T, Vliegenthart JF, Loffler A, Hofsteenge J. The hexopyranosyl residue that is Cglycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase U<sub>s</sub> is alphanomannopyranose. *Biochemistry*. 1995; 34(37):11785-9.
- [45] Krieg J, Glasner W, Vicentini A, Doucey MA, Loffler A, Hess D, Hofsteenge J. CMannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. *J Biol Chem*. 1997; 272(42):26687-92.
- [46] Finne, J. Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J. Biol. Chem*. 1982 ; 257 :11966-11970
- [47] Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 947(2):287-306.
- [48] Orczyk-Pawilowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007; 61:240-52
- [49] Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473(1):67-95.
- [50] Kopitz, J., K. Sinz, et al. "Partial characterization and enrichment of a membrane-bound sialidase specific for gangliosides from human brain tissue." *Eur. J. Biochem*. 1997; 248(2): 527-534.
- [51] Kobata, A. and S. Takasaki. *Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates*, CRC Press. 1992.
- [52] Kolter, T., T. Doering, et al. "Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism." *Biochem. Soc. Trans*. 1999; 27(4): 409-415.
- [53] Kolter, T., R. L. Proia, et al. "Combinatorial ganglioside biosynthesis." *J. Biol. Chem*. 2002; 277(29): 25859-25862.
- [54] Maccioni, H. J., J. L. Daniotti, et al. "Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus." *Biochim. Biophys. Acta*. 1999; 1437(2): 101-118.
- [55] Yu, R. K., L. J. Macala, et al. "Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain." *J. Neurochem*. 1998; 50: 1825-1829.
- [56] Brown, D. A. and E. London "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu. Rev. Cell Devl. Biol*. 1998; 14: 111-136.
- [57] C. M. John, M. Liu, G. A. Jarvis. Profiles of structural heterogeneity in native lipooligosaccharides of *Neisseria* and cytokine induction. *J. Lipid Res*. 2009, 50, 424.

- [58] Simons, K. and E. Ikonen "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 1997; 387: 569-572.
- [59] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473(1):4-8.
- [60] Vogt G, Vogt B, Chuzhanova N, Julenius K, Cooper DN, Casanova JL. Gain-of-glycosylation mutations. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17(3):245-51.
- [61] An HJ, Gip P, Kim J et al. Extensive determination of glycan heterogeneity reveals an unusual abundance of high-mannose glycans in enriched plasma membranes of human embryonic stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, (2011).
- [62] Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(3):156-63. Erratum in: *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(5):251.
- [63] Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*. 1985; 116(6):2293-9.
- [64] Adar R, Streicher H, Rozenblatt S, Sharon N. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. *Eur J Biochem*. 1997; 249(3):684-9.
- [65] Yet MG, Wold F. The distribution of glycan structures in individual N-glycosylation sites in animal and plant glycoproteins. *Arch Biochem Biophys*. 1990; 278(2):356-64.
- [66] Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*. 1982; 51:531-54.
- [67] Park EI, Mi Y, Unverzagt C, Gabius HJ, Baenziger JU. The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(47):17125-9.
- [68] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14(11):53R-62R.
- [69] Wilhelm J, Kalyan NK, Lee SG, Hum WT, Rappaport R, Hung PP. Deglycosylation increases the fibrinolytic activity of a deletion mutant of tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 1990; 63(3):464-71.
- [70] Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1998; 33(3):151-208
- [71] Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. 2003 ; 300(5625):1524-5.
- [72] Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med*. 1990; 171(3):597-613.

- [73] Taylor ME, Drickamer K. Structure-function analysis of C-type animal lectins. *Methods Enzymol.* 2003; 363:3-16.
- [74] Dear AE, Medcalf RL. The urokinase-type-plasminogen-activator receptor (CD87) is a pleiotropic molecule. *Eur J Biochem.* 1998; 252(2):185-93.
- [75] Darling RJ, Kuchibhotla U, Glaesner W, Micanovic R, Witcher DR, Beals JM. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. *Biochemistry.* 2002; 41(49):14524-31.
- [76] Zambrano E, Zarinan T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine.* 1999; 10(2):113-21.
- [77] Liu WK, Young JD, Ward DN. Deglycosylated ovine lutropin: preparation and characterization by in vitro binding and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 1984; 37(1):29- 39.
- [78] Yoshimura M, Hershman JM. Thyrotropic action of human chorionic gonadotropin. *Thyroid.* 1995; 5(5):425-34.
- [79] Haltiwanger RS. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2002; 12(5):593-8.
- [80] Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev.* 1996; 96(2):683-720.
- [81] Warren G, Malhotra V. The organisation of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10(4):493-8.
- [82] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007; 446(7139):1017-22.
- [83] Yamashita K, Hara-Kuge S, Ohkura T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473(1):147-60.
- [84] Oka T, Ungar D, Hughson FM, Krieger M. The COG and COPI complexes interact to control the abundance of GEARs, a subset of Golgi integral membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(5):2423-35.
- [85] Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1726(2):121-37
- [86] Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology.* 2005; 15(6):1R-15R.
- [87] Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1695(1-3):19-31.

- [88] Ahner A, Brodsky JL. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol.* 2004; 14(9):474-8.
- [89] Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem.* 2004; 263(1-2):55-72.
- [90] Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12:575-625.
- [91] Mason RW. Lysosomal metabolism of proteins. In Lloyd JB and Mason RW (eds.) *Subcellular biochemistry : biology of the lysosome.* New York. 1996; (27)159-190.
- [92] Aronson NN Jr. Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1455(2-3):139-54.
- [93] Daniel PF, Winchester B, Warren CD. Mammalian alpha-mannosidases--multiple forms but a common purpose? *Glycobiology.* 1994; 4(5):551-66.
- [94] Takagaki K, Nakamura T, Endo M. Demonstration of an endo-beta-galactosidase and an endo-beta-xylosidase that degrade the proteoglycan linkage region. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 966(1):94-8.
- [95] Pshezhetsky AV, Potier M. Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of beta-galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase. Possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. *J Biol Chem.* 1996; 271(45):28359-65.
- [96] Brooks, S. A., M. V. Dwek, et al. *Functional & Molecular Glycobiology.* Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd. 2002.
- [97] Kleene, R. and E. G. Berger "The molecular and cell biology of glycosyltransferases." *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1154: 283-285.
- [98] Campbell, J. A., G. J. Davies, et al. "A classification of nucleotide-diphosphosugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities." *Biochem. J.* 1998; 329: 719.
- [99] Henrissat, B., P. M. Coutinho, et al. "A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol. Biol.* 2001; 47: 55-72.
- [100] Coutinho, P. M., E. Deleurey, et al. "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." *J. Mol. Biol.* 2003; 328: 307-317.
- [101] Paulson, J. C. and K. Colley. "Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation." *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 17615-17618.
- [102] De Vries, T., M. M. Palcic, et al. "Acceptor specificity of GDP-Fuc:GalB1,4GlcNAc-R alpha3-fucosyltransferase VI (FucT VI) expressed in insect cells as soluble, secreted enzyme." *Glycobiology* 1997; 7: 921-927.
- [103] Mollicone, R., A. Gibaud, et al. "Acceptor specificity and tissue distribution of the human alpha-fucosyltransferases." *Eur. J. Biochem.* 1990; 191: 169-176.

- [104] Helenius, A. and M. Aebi "Intracellular function of N-linked glycans." *Science* 2001; 291: 2364-2369.
- [105] Oriol, R. ABO, Hh, Lewis, and Secretion. Serology, genetics, and tissue distribution. New York, Plenum Press.1995.
- [106] Miyoshi, E., K. Noda, et al. "The alpha 1-6 fucosyltransferase gene and its biological significance." *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1473: 9-20.
- [107] Hakomori, S. "Antigen structure and genetic basis of histo blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer." *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1473: 247-266.
- [108] Menon, S., M. Stahl, et al. "Stereochemical course and steady state mechanism of the reaction catalyzed by the GDP-Fucose synthetase from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 26743-26750.
- [109] Greenwell, P. "Blood group antigens: Molecules seeking a function?" *Glycoconj. J.* 1997; 14: 159-173.
- [110] Oriol, R., J. Danilovs, et al. "A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene." *Am. J. Hum. Genet.* 1981; 33(3): 421-431
- [111] Larsen, R. D., L. K. Ernst, et al. "Molecular cloning, sequence, and expression of human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 6674-6678.
- [112] Kelly, R. J., S. Rouquier, et al. "Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha (1,2) fucosyltransferase gene (FUT2). homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with non-secretor phenotype." *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 4640-4649.
- [113] Iwase, H., I. Ishii, et al. "Release of oligosaccharides processing reducing-end N-acetylgalactosamine from mucus glycoprotein in *Streptomyces* sp. OH-11242 culture medium through action of endo-type glucosidase." *Biochem. Biophys. Acta* 1988; 151: 422-428.
- [114] Roos, C., M. Kolmer, et al. "Composition of *Drosophila melanogaster* proteole involved in fucosylated glycan metabolism." *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 3168-3175.
- [115] Wilson, J. R., D. Williams, et al. "N-acetylglucosamine linkage to alpha mannose residue as a signal of L-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue of glycopeptide from alpha1-acid glycoprotein." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976; 72: 909-916.
- [116] Yanagidani, S., N. Uozomi, et al. "Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:N-acetyl-B-D-glucosaminide: alpha1,6-fucosyltransferase (alpha1-6FucT) from human gastric cancer MKN45 cells." *J. Biochem.* 1997; 121: 626-632.

- [117] Hallgren, P., A. Lundblad, et al. "A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine." *J. Biol. Chem.* 1975; 250: 5312-5314.
- [118] Wang, Y., L. Saho, et al. "Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. molecular cloning and expression of a novel GDP-Fucose protein O-fucosyltransferase." *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 40338-40445.
- [119] Blix, F. G., A. Gottschalk, et al. "Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids." *Nature* 1957; 179(4569): 1088.
- [120] Schauer, R. and J. P. Kamerling. *Chemistry and biochemistry of sialic acids. Glycoproteins II.* J. Montreuil, J. F. Vliegthart and H. Schachter. Amsterdam, Elsevier 1992; 243-402.
- [121] Izumida, Y. "Roles of plasma proteins and surface negative charge of erythrocytes in erythrocyte aggregation." *Nippon Seirigaku Zasshi* 1991; 53: 1-12.
- [122] Thotakura, N. R., M. W. Szkudlinski, et al. "Structure function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrothropin by sequential deglycosylation and resialylation." *Glycobiology* 1994; 4: 525-533.
- [123] Pilatte, Y., J. Bignon, et al. "Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity." *Glycobiology* 1993; 3(3): 201-218.
- [124] Marino, J. H., M. Hoffman, et al. "Sialyltransferase mRNBA abundances in B cells are strictly controlled, correlated with conate lectin binding, and differentially responsive to immune signaling in vitro." *Glycobiology*. 2004.
- [125] Angstrom, J., S. Teneberg, et al. "Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 11859-11863.
- [126] Hirno, S., S. Kelm, et al. "Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to alpha2,3-linked sialic acids." *Glycoconj. J.* 1996; 13(6): 1005-1011.
- [127] Rogers, G. N., G. Herrler, et al. "Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells." *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 5947-5951.
- [128] Schengrund, C. L. and N. J. Ringler "Binding of vibrio cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands." *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13233-13237.
- [129] Schenkman, S., M. A. Ferguson, et al. "Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycoposphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosma cruzi*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 59: 293-303.

- [130] Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, et al. "The human sialyltransferase family." *Biochimie* 2001; 83: 727-737.
- [131] Grundmann, U., C. Nerlich, et al. "Complete cDNA sequence encoding human B-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase." *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 667.
- [132] Krzewinski-Recchi, M. A., S. Julien, et al. "Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II." *Eur. J. Biochem.* 2003; 270(5): 950-961.
- [133] Ikehara, Y., N. Kojima, et al. "Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine-alpha-2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer associated sialyl-Tn antigens." *Glycobiology* 1999; 9: 1213-1224.
- [134] Julien, S., M. A. Krzewinski-Recchi, et al. "Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I)cDNA." *Glycoconj. J.* 2001; 18(11-12): 883-893.
- [135] Samyn-Petit, B., M. A. Krzewinski-Recchi, et al. "Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells." *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1474: 201-211.
- [136] Okajima, T., S. Fukumoto, et al. "Molecular Cloning of Brain-specific GD1 Synthase (ST6GalNAc V) Containing CAG/Glutamine Repeats." *J. Biol. Chem.* 1999; 274(43): 30557-30562.
- [137] Arndt NX, Tiralongo J, Madge PD, von Itzstein M, Day CJ. Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, (2011). 112(9), 2230-2240
- [138] Niazi, S., and State, D., *Cancer Res.*,(1948) 12, 653
- [143] Corfield, T. "Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition." *Glycobiology* 1992; 2: 509-521.
- [144] Galen, J. E., J. M. Ketley, et al. "Role of vibrio cholerae neuraminidase in the function of the cholera toxin." *Infect. Immun.* 1992; 60: 406-415.
- [145] Colman, P. M. and C. W. Ward "Structure and diversity of influenza virus neuraminidase." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1985; 114: 177-255.
- [146] Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473(1):21-34.
- [147] Singh R, Campbell BJ, Yu LG, Fernig DG, Milton JD, Goodlad RA, et al. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology* 2001 ; 11 : 587-92.



- [148] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(16):10231-3.
- [149] Kanska G, Guillot J, de Latour M, Fonck Y. Expression of Tn antigen and N-acetylglucosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83D4. *Int J Oncol* 1998 ; 12 : 361-7.
- [150] Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer : which ones are clinically useful? *Clin Biochem* 2001 ; 34 : 347-52.
- [151] Gabius HJ, Gabius S, Brinck U, Schauer A. Endogenous lectins with specificity to beta-galactosides and alpha- or beta- N-acetyl-galactosaminides in human breast cancer. Their glycohistochemical detection in tissue sections by synthetically different types of neoglycoproteins, their quantitation on cultured cells by neoglycoenzymes and their usefulness as targets in lectin mediated phototherapy in vitro. *Path Res Pract* 1990 ; 186 : 597-607.
- [152] Kanska G, Favry D, Guillot J, Bernard-Gallon D, de Latour M, Fonck Y. Expression des antigènes T et Tn dans les cancers du sein. *C R Soc Biol* 1998 ; 192 : 733-47.
- [153] Hiraizumi S, Takasaki S, Ohuchi N, Harada Y, Nose M, Mori S, Kobata A. Altered glycosylation of membrane glycoproteins associated with human mammary carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1992 ; 83 : 1063-72.
- [154] Schachter H. The clinical relevance of glycobiology. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 1579-82.
- [155] U. Galili, J. Buehler, S. B. Shoheit, B. A. Macher, *J. Exp. Med.* 1987, 165, 693- 704.
- [156] J. L. Avila, M. Rojas, U. Galili, *J. Immunol.* 1990, 29, 3959-3965.
- [157] Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest.* 1991;87:1-5.
- [158] Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69:11-25.
- [159] Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Kapyla J, Pihlajaniemi T. et al. Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem.* 2000; 275:8255-8261.
- [160] Wong NC, Mueller BM, Barbas CF, Ruminiski P, Quaranta V. et al. Alpha v integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis.* 1998; 16:50-61.
- [161] Tashiro K, Monji A, Yoshida I, Hayashi Y, Matsuda K. et al. An IKLLI-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and proliferation, represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* 1999; 340:119-126.
- [162] Camper L, Hellman U, Lundgren-Akerlund E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol*

Chem. 1998; 273:20383–20389.

[163] Lehnert K, Ni J, Leung E, Gough SM, Weaver A. et al. Cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the novel human integrin alpha11 subunit (ITGA11). *Genomics*. 1999; 60:179–187.

[164] Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:690–696

[165] Tuckwell DS, Reid KB, Barnes MJ, Humphries MJ. The A-domain of integrin alpha 2 binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif. *Eur J Biochem*. 1996; 241:732–739.

[166] Huang C, Lu C, Springer TA. Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin beta2 subunit requires association with the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:3156–3161.

[167] Danen EH, Jansen KF, Van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ. et al. Alpha v-integrins in human melanoma: Gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int J Cancer*. 1995; 61:491–496.

[168] Zutter MM, Krigman HR, Santoro SA. Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast. Analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol*. 1993; 142:1439–1448.

[169] Chan BM, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science*. 1991; 251:1600–1602.

[170] Vihinen P, Riikonen T, Laine A, Heino J. Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen. *Cell Growth Differ*. 1996; 7:439–447.

[171] Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 1997; 385:537–540.

[172] M.E. Kremser, M. Przybyło, D. Hoja-Łukowicz, E. Pocheć, A. Amoresano, A. Carpentieri, M. Bubka, A. Lityńska, Characterisation of  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin N oligosaccharides in metastatic melanoma WM9 and WM239 cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1780; 1421–1431.

[173] N.L. Prokopishyn, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, S. Laferte, Integrin  $\alpha 3\beta 1$  expressed by human colon cancer cells is a major carrier of oncodevelopmental carbohydrate epitopes, *J. Cell Biochem*. 1999; 72 189–209.

[174] Lityńska, E. Pocheć, D. Hoja-Łukowicz, E. Kremser, P. Laidler, A. Amoresano, Ch. Monti, The structure of the oligosaccharides of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from human uterine epithelium (HCV29) cell line, *Acta Biochim. Pol.* 49 2002; 491–500.

- [175] Lityńska, M. Przybyło, E. Pocheć, P. Laidler, Adhesion properties of human bladder cell lines with extracellular matrix components: the role of integrins and glycosylation, *Acta Biochim. Pol.* 2002; 49 643–650.
- [176] Lityńska, M. Przybyło, E. Pocheć, E.Kremser, D.Hoja-Łukowicz, U. Sulowska, Does glycosylation of melanoma cells influence their interactions with fibronectin? *Biochimie* 2006;88 527–534.
- [177] M.E. Kremser, M. Przybyło, D. Hoja-Łukowicz, E. Pocheć, A. Amoresano, A. Carpentieri, M. Bubka, A. Lityńska, Characterisation of  $\alpha\beta1$  and  $\alpha\beta3$  integrin N oligosaccharides in metastatic melanoma WM9 and WM239 cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1780 1421–1431.
- [178] Y. Zhao, T. Nakagawa, S. Itoh, K. Inamori, T. Isaji, Y. Kariya, A. Kondo, E. Miyoshi, K. Miyazaki, N. Kawasaki, N. Taniguchi, J. Gu, N Acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-Acetylglucosaminyltransferase V on  $\alpha\beta1$  integrin mediated cell migration, *J. Biol. Chem.* 2006; 281 32122–32130.
- [179] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. – Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350-356.
- [180] Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. - New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 1973, 54, 484-489.
- [181] Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N. - Methods of study of the structure of glycoproteins. *J. Pharm. Bel.*, 1963, 18, 529-546.
- [182] Chaplin (M.F.) et Kennedy (J.F.). – Carbohydrate Analysis. A practical approach, IRL Press, Oxford, 1994.
- [183] Dumitriu (S.). – Polysaccharides in Medicinal Applications, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [184] Hounsell (E.). – Glycoprotein analysis in Biomedicine. In J. Walker (ed), *Methods in molecular biology*, Humana Press, Totowa (N.J.), 1993.
- [185] Montreuil (J.), Vliegenthart (J.F.G.) et Schachter (H.). – Glycoproteins, *Comprehensive Biochemistry*, 1995; vol. 29a and Elsevier, Amsterdam. 1997; vol. 29b.
- [186] Verbert (A.). – Methods on Glycoconjugates. A Laboratory manual, Harwood Academic, Chur (CH), 1995.
- [187] Albersheim P., Nevins D. J., English P. D. and Karr A. A methode for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 1967; 5, 340-345.
- [188] Schwarzmann G. O. H. and Jeanloz R. W. Separation by gas-liquid chromatography, and identification by mass spectrometry, of the methyl ether of 2-deoxy-2-(N-methylacetamido)-D-glucose. *Carbohydr. Res.* 1974; 34, 161

- [189] Anumula K. R. and Taylor P. B. A comprehensive procedure for preparation of partially methyleted aldito acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* 1992; 203, 101-108.
- [190] Griggs L. J., Post A., White E. R., Finkelstein J. A., Moechel W. E., Holden K. G., Zarembo J. E. and Weisbach J. A. Identification and quantitation of aldito acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1971; 43, 369-381.
- [191] Laine R. A. and Sweeley C. C. O-methyl oximes sugars. Analysis as Otrimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* 1973; 27, 199-213.
- [192] Lehnhardt W. F. and Winzler J. Determination of neutral sugars in glycoproteins by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1968; 34, 471-479.
- [193] Chaplin M. F. A rapid and selective methode for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1982; 123, 336-341.
- [194] J. T. Clarke, "Simplified "Disc" (Polyaceylamide Gel) electrophoresis," *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1964; vol. 121 no. 2,pp. 428-436.
- [195] T. H. Steinberg, "Protein gel staining methods: an introduction and overview," *Methods in Enzymology*, 2009, vol. 463 541-563.
- [196] Hart, B. Schulenberg, T. H. Steinberg, W. Y. Leung and W. F. Patton, "Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain," *Electrophoresis*, 2003, vol. 24 no. 4,pp. 588-598.
- [197] H. Lis and N. Sharon, "Lectins as molecules and as tools," *Annual Review of Biochemistry*, 1986, vol. 55 35-67.
- [198] P. Gravel, O. Golaz, C. Walzer, D. F. Hochstrasser, H. Turler and L. P. Balant, "Analysis of glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using lectin blotting revealed by chemiluminescence," *Analytical Biochemistry*, 1994, vol. 221 no. 1,pp. 66-71.
- [199] Wiegandt (H.). – Glycolipids. In A. Neuberger and L.L.M. van Deenen, *Comprehensive Biochemistry*, vol. 10, pp. 1-188, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [200] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 246(4926):64-71.
- [201] Karas M., Bachmann D., Bach U., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 1987, 78, 53-68.
- [202] Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, 2, 151-152.

- [203] Kussmann M., Nordhoff E., Rabek-Nielsen H., Haebel S., Rossel-Larsen M., Jakobsen L., Gbom J., Mirgorodskaya E., Kroll-Kristensen A., Palm L., Roepstorff P. Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes, *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32, 593-601.
- [204] Tang K., S. L. Allman, Chen C.H., Chang L.Y., Schell M. Matrix-assisted laser desorption/ionization of restriction enzyme-digested DNA, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994, 8, 183-186.
- [205] Gobom J., Nordhoff E., Mirgorodskaya E., Ekman R., Roepstorff P. Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 1999; 34, 105-116.
- [206] Schuerenberg M., Luebbert C., Eickhoff H., Kalkum M., Lehrach H., Nordhoff E. Prestructured MALDI-MS sample supports, *Anal. Chem.*, 2000; 72, 3436-3442.
- [207] Beavis R., Chait B. Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption, *Chem. Phys. Lett.*, 1991; 181, 479.
- [208] Knochenmuss R., Zenobi R. MALDI ionization : the role of in-plume processes, *Chem. Rev.*, 2003; 103 (2), 441-452.
- [209] Sheng L.S., Covey J.E., Shew S.L., Winger B.E., Campana J.E. Matrix-assisted laser desorption ionization Fourier-transform mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994; 8, 498-500.
- [210] Schwartz J.C., Bier M.E. Matrix-assisted laser desorption of peptides and proteins using a quadrupole ion trap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1993; 7, 27-32.
- [211] Hill J.A., Annan R.S., Biemann K. Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1991; 5, 395-399.
- [212] Wiley W.C., McLaren I.H. Time-of-flight mass spectrometry with improved resolution, *Rev. Sci. Instrum.*, 1955; 26, 1150-1157.
- [213] Vestal M.L., Juhasz P., Martin S.A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1995; 9, 1044.
- [214] Brown R.S., Lennon J.J. Mass resolution by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, *Anal. Chem.*, 1995; 67, 1998.
- [215] Mamyrin B.A., Karataev V.I., Shmikk D.V., Zagulin V.A. Mass reflectron. New nonmagnetic time-of-flight high-resolution mass spectrometer, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.*, 1973; 64, 82.

- [216] Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R. Peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992; 6, 105-108.
- [217] Karas M., Bach U., Strupat K., Hillenkamp F., Tzarbopoulos A., Pramanik B.N. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 1995; 67, 675-679.
- [218] Burton R.D., Watson C.H., Eyler J.R., Lang G.L., Powell D.H., Avery M.Y. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997; 11, 443-446.
- [219] Roepstorff, P. et Fohlman, J. "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* 1984 ; 11(11): 601.
- [220] Biemann, K. "Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure." *Biomed Environ Mass Spectrom* 1988; 16(1-12): 99-111.
- [221] Domon, B. et Costello, C. E. "A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates." *Glycoconjugate J* 1988 ; 5: 397-409.
- [222] Harvey, D. J. "Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry." *Proteomics* 2005; 5(7): 1774-1786.
- [223] Viseux N., De Hoffmann E., Domon B. Structural assignment of permethylated oligosaccharide subunits using sequential tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 1998; 23, 4951-4959.
- [224] Brooks, S. A. "Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: current status and future perspectives." *Mol Biotechnol* 2009; 43(1): 76-88.
- [225] Dalpathado, D. S. et Desaire, H. "Glycopeptide analysis by mass spectrometry." *Analyst* 2008; 133(6): 731-738.
- [226] Nawarak, J., Phutrakul, S. et Chen, S. T. "Analysis of lectin-bound glycoproteins in snake venom from the Elapidae and Viperidae families." *J Proteome Res* 2004 ; 3(3): 383-392.
- [227] Zanetta J. P., Breckenridge W. C. and Vincendon G. Analysis of Monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives : Application to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.* 1972; 69,291-304.
- [228] Harvey DJ. Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics.* 2005; 5(7):1774-86.
- [229] Papac DI, Wong A, Jones AJ. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 1996; 68(18):3215-23.

- [230] Powell AK, Harvey DJ. Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996; 10(9):1027-32.
- [231] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 1984; 131 : 209.,
- [232] Ciucanu I, Costello CE. Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J Am Chem Soc.* 2003; 125(52):16213-9.,
- [233] Rudd PM, Guile GR, Küster B, Harvey DJ, Opdenakker G, Dwek RA. Oligosaccharide sequencing technology. *Nature.* 1997; 388(6638):205-7.
- [234] Geyer H, Schmitt S, Wuhler M, Geyer R. Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal Chem.* 1999; 71(2):476-82.
- [235] Gimenez, E., Benavente, F., Barbosa, J. et Sanz-Nebot, V. "Towards a reliable molecular mass determination of intact glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrum* 2007 ; 21(16): 2555-2563.
- [236] Morelle, W. et Michalski, J. C. "Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry." *Nat Protoc* 2007 ; 2(7): 1585-1602.
- [237] O'Neill, R. A. "Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis." *J Chromatogr A* 1996; 720(1-2): 201-215.
- [238] Geyer, H. et Geyer, R. "Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation." *Biochim Biophys Acta* 2006 ; 1764(12): 1853-1869.
- [239] Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M. et Parekh, R. B. "Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid." *Anal Biochem* 1995; 230(2): 229-238.
- [240] Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., Atwood, J. A., Dalton, S., Orlando, R. et Pierce, M. "Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides." *J Proteome Res.* 2009.
- [241] Carr, S. A., Huddleston, M. J. et Bean, M. F. "Selective identification and differentiation of Nand O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry." *Protein Sci* 1993; 2(2): 183-196.
- [242] Peterman, S. M. et Mulholland, J. J. "A novel approach for identification and characterization of glycoproteins using a hybrid linear ion trap/FT-ICR mass spectrometer." *J Am Soc Mass Spectrom* 2006 ; 17(2): 168-179.
- [243] Sullivan, B., Addona, T. A. et Carr, S. A. "Selective detection of glycopeptides on ion trap mass spectrometers." *Anal Chem* 2004 ; 76(11): 3112-3118.

- [244] Harvey DJ. Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5(7):1774-86.
- [245] Wuhler, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H. et Deelder, A. M. "Protein glycosylation analyzed by normal-phase nano-liquid chromatography--mass spectrometry of glycopeptides." *Anal Chem* 2005; 77(3): 886-894.
- [246] Deshpande, N., Jensen, P. H., Packer, N. H. et Kolarich, D. "GlycoSpectrumScan: fishing glycopeptides from MS spectra of protease digests of human colostrum sIgA." *J Proteome Res* 2010 ; 9(2): 1063-1075.
- [247] Wu, Y., Mechref, Y., Klouckova, I., Mayampurath, A., Novotny, M. V. et Tang, H. "Mapping site-specific protein N-glycosylations through liquid chromatography/mass spectrometry and targeted tandem mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010; 24(7): 965-972.
- [248] Sagi D, Peter-Katalinic J, Conradt HS, Nimtz M. Sequencing of tri- and tetraantennary N-glycans containing sialic acid by negative mode ESI QTOF tandem MS. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002; 13(9):1138-48.
- [249] Morelle, W., Michalski, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protoc*. 2007; 2, 1585-1602.
- [250] Morelle, W., Michalski, J. C. Glycomics and mass spectrometry. *Curr. Pharmaceut. Design*. 2005; 11, 2615–2645.
- [251] Rudd, P.M. and Dwek, R.A. Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol*. 1997; 8, 488–497.
- [252] Franzen J., Frey R., Holle A., Kräuter K.O. Recent progress in matrix-assisted laser desorption ionization postsource decay, *Int. J. Mass Spectrom*. 2000; 206, 275-286.
- [253] Simms, M.S., Hughes, O.D., Limb, M., Price, M.R. and Bishop, M.C. MUC1 mucin as a tumor marker in bladder cancer. *B.J.U. Int*. 1999; 84, 350-2.
- [254] Rawal, R.M., Patel, P.S., Patel, B.P., Raval, G.N., Patel, M.M., Bhatavdekar, J.M., and Dixit, S.A. Evaluation of glycoprotein constituents in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Head Neck*, 1999; 21, 192-7.
- [255] Sikut, R., Sikut, A., Zhang, K., Baekstrom, D. and Hansson, G.C. Reactivity of antibodies with highly glycosylated MUC1 mucins from colon carcinoma cells and bile. *Tumour Biol*. 1998; 19, 122-6.
- [256] Segal-Eiras, A. and Croce, M.V. Breast cancer associated mucin: a review. *Allergo Immunopathology*. 1997; 25, 176-81.



- [257] Winzler, R. J. Determination of Serum Glycoproteins. In: D. Glick (ed), *Methods of Biochemical Analysis*, New York: Interscience Publishers, Inc, 1955; Vol. 2, pp. 279-31.
- [258] Hooda, H.S., Seth, S., Chopra, M. and Patwa, M.B. Serum mucoprotein – A prognostic tumour marker; *The Indian Practitioner*, 1999; 52, 615-618.
- [259] Mukhopadhyay T, Giri A, Dasgupta A. Evaluation of Serum Mucoproteins in Patients suffering from Liver Cancers. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry* 2003; 18: 131-135.
- [260] Raval RM, Patel PS, Patel BP, Raval GN, Patel MM, Bhatavdekar JM, Dixit SA. Evaluation of Glycoprotein constituents in Head and Neck Cancer patients undergoing Radiotherapy. *Head Neck* 1999; 21: 192-197.
- [261] Pahwa MB, Chopra M, Seth S, Hooda HS. Serum Mucoproteins- As a Prognostic Tumor Marker. *The Indian Practitioner* 1999; 52: 615-618.
- [262] H R Mali, M B Bhatt, S M Natu, N Bhatia. Effect of Radiotherapy on Serum Mucoprotein Level in Carcinoma of Larynx and Pharynx. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 2001; 58: 15-17.
- [263] Emil IM, Kitei M. *Sugars that Heal, The New Healing Science of Glyconutrients*. New York: Ballantine Publishing; 2001 ; p. 255.
- [264] Elkins, Rita MH. *Miracle Sugars: The Glyconutrient Link to Better Health*. Pleasant Grove, Utah, USA: Woodland Publishing; 2003 ; p. 220.
- [265] Dische, Z., and Shettles. L. B. A Specific Color Reaction of Methylpentoses and a Spectrophotometric Micromethod for Their Determination. *J. Biol. Chem*, 1948; 175: 595-603.
- [266] Rosato, F. E., and Seltzer, M. H. Serum Protein-Bound Fucose and Carcinoma of the Female Breast. *Am. J. Surg*, 1969; 118: 61-64.
- [267] Song T, Aldredge D, Lebrilla CB. A method for in-depth structural annotation of human serum glycans that yields biological variations. *Anal Chem*. (2015) ;87(15) :7754–62.
- [268] Shetlar, M.R., Shetlar, C.L., Richmond, V., and Everett, M.R. The Polysaccharide Content of Serum Fractions in Carcinoma, Arthritis and Infections. *Cancer Res*. 1950; 10: 681-683.
- [269] Spiro, R.G. Glycoproteins: Structure, Metabolism and Biology. *New Eng J. Med*. 1963; 269:566-573.
- [270] Hadjivassiliou, A., Castanaki, A., Hristou, G., and Lissaios, B. The Diagnostic Value of Protein Bound Serum Fucose in Cancer of the Breast. *Surg. Gynecol. Obstet*, 1975; 140: 239-240.
- [271] Winzler, R.J., and Burk, D. Blood Protease and Cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 1944; 4: 417-421.
- [272] Greenspan, E. M., Tapper, B., Terry, L. L., and Schoenbach, E. B. The Serum Mucoproteins as Aid in the Differentiation of Neoplastic from Primary Parenchymatous Liver Disease. *J. Lab. Clin. Med*, 1952; 39: 44-56.

- [273] Lambana, S. (Tatsumura, T.). Clinical Value of Protein-Bound Fucose in Patients with Carcinoma and Other Diseases. *Gann*, 1976; 67: 379-388.
- [274] SCHAUER, R.: Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acid. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1982; 40: 131-234.
- [275] Narayanan, S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1994; 24, 376- 384.
- [276] HAQ, M., HAQ, S., TUTT, P., CROOK, M.: Serum total sialic acid and lipid-associated sialic acid in normal individuals patients with myocardial infarction and their relationship to acute phase proteins. *Ann. Clin. Biochem.*, 1993; 30: 383-386.
- [277] STEFENELLI, N., KLOTZ, H., ENGEL, A., BAUER, P.: Serum sialic acid in malignant tumours. Bacterial infections and chronic liver diseases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1985; 109: 55-59.
- [278] Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24:376–84.
- [279] Crook M. The determination of plasma or serum sialic acid. *Clin. Biochem* 1993; 26:31–8.
- [280] Dwivedi C, Dixit M, Hardy RE. Plasma lipid-bound sialic acid alterations in neoplastic diseases. *Experientia* 1990; 46:91–4.
- [281] Patel PS, Raval GN, Rawal RM, Patel GH, Balar DB, Shah PM, Patel DD. Comparison between serum levels of carcinoembryonic antigen, sialic acid and phosphohexose isomerase in lung cancer. *Neoplasma* 1995; 42:271–4.
- [282] Tautu C, Pee D, Dunsmore M, Prorok JJ, Alhadeff JA. Evaluation of serum sialic acid and carcinoembryonic antigen for the detection of early-stage colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* 1991; 5:247–54.
- [283] Shimizu Y, Hasumi K, Masubuchi K, Okudaira Y. Management of patients with gynecologic cancer by serum sialic acid determination. *Gynecol Oncol* 1989; 33:231–6.
- [284] Gatchev O, Rastam L, Lindberg G, et al. Tumors of the central nervous system and serum sialic acid concentration in men and women. *Br J Cancer* 1993; 68:425–7.
- [285] Paula J Waters, Elizabeth Lewry and Charles A Pennock Measurement of sialic acid in serum and urine: clinical applications and limitations *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 625-637
- [286] Gomall, A.C., Bardawill, C.J. and David, H.M. Determination of serum proteins by means of Biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 1949; 177, 751-766
- [287] Gatchev O, Rastam L, Lindberg G, et al. Tumors of the central nervous system and serum sialic acid concentration in men and women. *Br J Cancer* 1993; 68:425–7.
- [288] Li Y-L, Wu G-Z, Zeng L et al. Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by the cell recognition molecule L1 via PLC $\gamma$  and cooperate and modulate embryonic stem cell survival and proliferation. *FEBS Letters*, (2009). 583(4), 703-710.

- [289] Nwosu CC, Seipert RR, Strum JS, Hua SS, An HJ, Zivkovic AM, et al. Simultaneous and extensive site-specific N- and O-glycosylation analysis in protein mixtures. *J Proteome Res.* (2011);10(5):2612–24.
- [290] Erbil. K.M., Jones, J.D. and Klee, G.G. Use and limitations of serum total and lipid-bound sialic acid concentrations as markers for colorectal cancer, *Cancer*, 1985; 55, 404-409.
- [291] Plucinsky, M.C., Riley, W.M., Prorok, J.J. and Alhadeff, J.A. Total and lipid-associated serum sialic acid levels in cancer patients with different primary sites and differing degrees of metastatic involvement, *Cancer*, 1986; 58, 2680-2685.
- [292] Kemmner, W., Schlag, P., Moller, P. and Brossmer, R. Homotypic aggregation and terminal glycosylation of cells from dissociated human colorectal tumor tissue, *Oncology*, 1992; 49, 6367.
- [293] Kim, Y S. and Isaacs, R. Glycoprotein metabolism in inflammatory and neoplastic diseases of the human colon, *Cancer Res.* 1975; 35, 2092-2097.
- [294] Kim. Y S., Isaac% R. and Perdomo, J.M. Alterations of membrane glycopeptides in human colonic adenocarcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974; 71, 4869-4873.
- [295] Dall'Glio, F., Malagolini, N., Di Stefano, G., Minni, F., Marrano, D. and Seralini-Cessi, F. Increased CMPNeuAc: Gal@1,4GlcNAc-R 012,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues, *Int. J. Cancer*, 1989; 44, 434-439.
- [296] Akamatsu, S., Yazawa, S., Tachikawa, T., Furuta, T., Okaichi, Y., Nakamura, J., Asao, T. and Nagamachi, Y.  $\alpha$ 2 + 3 Sialyltransferase associated with the synthesis of CA 19-9 in colorectal tumors, *Cancer*, 1996; 77, 1694-1700.
- [297] Akcay, T., Konukoglu, D., Eriisenci, A., Ataus, S., Dirican, A. and Uygur, C. Urinary excretion of sialic acid in patients with superficial bladder tumors, *Cancer Lett.*, 1994; 78, 7-9.
- [298] Erbil. K.M., Jones, J.D. and Klee, G.G. Use and limitations of serum total and lipid-bound sialic acid concentrations as markers for colorectal cancer, *Cancer*, 1985; 55, 404-409.
- [299] Griffiths, J. and Reynolds, S. Plasma sialyl transferase total and isoenzyme activity in the diagnosis of cancer of the colon, *Clin. Biochem.*, 1982; 15, 46-48.
- [300] Turner, G.A., Skillen, A.W., Buamah, P., Guthrie, D., Welsh, J., Harrison, J. and Kowalski, A. Relation between raised concentrations of fucose, sialic acid, and acute phase proteins in serum from patients with cancer: choosing suitable serum glycoprotein markers, *J. Clin. Pathol.*, 1985; 38, 588-592.
- [301] Liu, H.P., Yang, Z.S. and Zhang, S.S. The application of leukocyte adherence inhibition assay to patients with colorectal cancer. Comparison with serum level of carcinoembryonic antigen and sialic acid, *Dis. Colon Rectum*, 1989; 32. 21 O-213.

- [302] Schauer, R. Sialic acids and their role as biological masks, Trends Biochem. Sci., 1985; 10, 357-360.
- [303] Shanmugam, V. and Nagrajan, B. Prognostic significance of lipid bound sialic acid in sera of cancer patients, Indian J. Cancer, 1986; 23, 173-177.
- [304] Dukes, C.E. The classification of cancer of the rectum, J. Pathol. Bacteriol., 1932; 35, 323-332.
- [305] Lityńska, A., Pocheć, E., Hoja-Lukowicz, D., Kremser, E., Laidler, P., Amoresano, A., Monti, C. The structure of the oligosaccharides of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from human ureter epithelium (HCV29) cell line. Acta Biochim. Polon. 2002; 49, 491–500.
- [306] Gehlsen, K.R., Sriramarao, P., Furcht, L.T., Skubitz, A.P.N. A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin  $\alpha$  chain represents a binding site for the  $\alpha 3\beta 1$  integrin. J. Cell Biol. 1992; 117, 449–459.
- [307] Laemmli, U.K., Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 1970; 80, 575–599.
- [308] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979; 76, 4350–4355.
- [309] Ruhaak LR, Miyamoto S, Kelly K, Lebrilla CB. N-Glycan Profiling of Dried Blood Spots. Analytical Chemistry, 84(1), 396-402 (2011).
- [310] Eble, J.A., Wucherpfennig, K.W., Gauthier, L., Dersch, P., Krukonis, E., Isberg, R.R., Hemler, M.E., Recombinant soluble human  $\alpha 3\beta 1$  integrin: purification, processing, regulation, and specific binding to laminin-5 and invasion in a mutually exclusive manner. Biochemistry, 1998; 37, 10945–10955.
- [311] Pocheć, E., Lityńska, A., Amoresano, A., Casbarra, A., Glycosylation profile of integrin  $\alpha 3\beta 1$  changes with melanoma progression. Biochim. Biophys. Acta 2003; 1643, 113–123.
- [312] M.G. Jasiulionis, R. Chammas, A.M. Ventura, L.R. Travassos, R.R. Brentani,  $\alpha 6\beta 1$ -integrin, a major cell surface carrier of h1 – 6-branched oligosaccharides, mediates migration of EJ-ras-transformed fibroblasts on laminin-1 independently of its glycosylation state, Cancer Res. 1996; 56, 1682–1689.
- [313] D. Bironaite, J.M. Nesland, H. Dalen, B. Risberg, M. Bryne, Protein glycosylation in development and disease, Tumor Biol. 2000; 21, 165–175.
- [314] T. Kawano, S. Takasaki, T.-W. Tao, A. Kobata, Altered glycosylation of  $\beta 1$  integrins associated with reduced adhesiveness to fibronectin and laminin, Int. J. Cancer, 1993; 53, 91–96.

- [315] N.L. Prokopishyn, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, S. Laferte, Integrin  $\alpha 3\beta 1$  expressed by human colon cancer cells is a major carrier of oncodevelopmental carbohydrate epitopes, *J. Cell. Biochem.* 1999; 72 189–209
- [316] M. Hummel, H.C. Hedrich, A. Hasilic, Elongation of N-acetyllactosamine repeats in diantennary oligosaccharides, *Eur. J. Biochem.* 1997; 245 428–433.
- [317] H.-B. Guo, Y. Zhang, H.-L. Chen, Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 127 231–236.
- [318] R.D. Cummings, S. Kornfeld, Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-affinity chromatography, *J. Biol. Chem.* 1982; 257 11230–11234.
- [319] Lityńska, A., Poheć, E., Hoja-Łukowicz, D., Kremser, E., Laidler, P., Amoresano, A., Monti, C. The structure of the oligosaccharides of  $\alpha 3\beta 1$  integrin from human ureter, epithelium (HCV29) cell line. *Acta Biochim. Polon.* 2002; 49, 491–500.
- [320] Eble, J.A., Wucherpfennig, K.W., Gauthier, L., Dersch, P., Krukonis, E., Isberg, R.R., Hemler, M.E., Recombinant soluble human  $\alpha 3\beta 1$  integrin: purification, processing, regulation, and specific binding to laminin-5 and invasion in a mutually exclusive manner. *Biochemistry*, 1998; 37, 10945–10955.
- [321] Poheć, E., Lityńska, A., Amoresano, A., Casbarra, A., Glycosylation profile of integrin  $\alpha 3\beta 1$  changes with melanoma progression. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1643, 113–123.
- [322] Gorelik, E., Galili, U., Raz, A., On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Met. Rev.* 2001 ; 20, 245–277.
- [323] Laferte, S., Dennis, J.W., Glycosylation dependent collagen-binding activities of two membrane glycoproteins in MDAY-D2 tumor cells. *Cancer Res.* 1988 ; 48, 4743–4748.
- [324] Guo, H.-B., Lee, I., Kamar, M., Akiyama, S.K., Pierce, M., Aberrant N-glycosylation of  $\beta 1$  integrin causes reduced  $\alpha 5\beta 1$  integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res.* 2002; 62, 6837–6845.
- [325] Balog CIA, Stavenhagen K, Fung WLJ et al. N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Molecular & Cellular Proteomics*, (2012).
- [326] Kawano, T., Takasaki, S., Tao, T.W., Kobata, A., Altered glycosylation of  $\beta 1$  integrins associated with reduced adhesiveness to fibronectin and laminin. *Int. J. Cancer* 1993; 53, 91–96.
- [327] Miyoshi, E., Noda, K., Ko, J.H., Ekuni, A., Kitada, T., Uozumi, N., Ikeda, Y., Matsuura, N., Sasaki, Y., Hayashi, N., Hori, M., Taniguchi, N., Overexpression of  $\alpha 1$ -6 fucosyltransferase in hepatoma cells

suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res.* 1999; 59, 2237–2243.

[328] Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E., Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;1473, 21–34.

[329] Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S., Schlag, P.M., Cell surface  $\alpha$ 2,6-sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 2002; 276, 101–110.

[330] El-Fasakhany, F.M., Uchimura, K., Kannagi, R., Muramatsu, T., A novel human Gal-3-O-sulfotransferase. *J. Biol.Chem.* 2001; 276, 26988–26994.

[331] Capom, C., Wieruszeski, J.M., Lemoine, J., Byrd, J.C., Leffler, H., Kim, Y.S., Sulfated Lewis X determinants as a major structural motif in glycans from LS174T-HM7 human colon carcinoma mucin. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 1957–1968.

[332] J.W. Dennis, M. Granovsky, Ch.E. Warren, Protein glycosylation in development and disease, *BioEssays*, 1999; 21 412– 421.

[333] Giannelli, G., Astigiano, S., Antonaci, S., Morini, M., Barbieri, O., Noonan, D., Albini, A., Role of the  $\alpha$ 3b1 and  $\alpha$ 6b4 integrins in tumor invasion. *Clin. Exp. Metastasis*, 2002 ; 19, 217–223.

[334] Semel, A.C., Seales, E.C., Singhal, A., Eklund, E.A., Colley, K.J., Bellis, S.L., Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 32830–32836.

[335] Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S., Schlag, P.M., Cell surface  $\alpha$ 2,6-sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 2002; 276, 101–110.

[336] Gehlsen, K.R., Sriramarao, P., Furcht, L.T., Skubitz, A.P.N. A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin  $\alpha$  chain represents a binding site for the  $\alpha$ 3b1 integrin. *J. Cell Biol.* 1992;117, 449–459.

[337] Rodrigo MAM, Zitka O, Krizkova S, Moulick A, Adam V, Kizek R.MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review. *J Pharm Biomed Anal.* (2014);95:245–55.

[338] Xin L, Zhang H, Liu H, Li Z. Equal ratio of graphite carbon to activated charcoal for enrichment of N-glycopeptides prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric identification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2012) 26(3) 269-274.

[339] Warren, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids, *J. Biol. Chem.*,(1959) 234, 1971-1975.

[340] Chen, C. H., Wang, S. H., Liu, C. H., Wu, Y. L., Wang, W. J., Huang, J., Hung, J. S., Lai, I. R., Liang, J. T., and Huang, M. C. beta-1,4- Galactosyltransferase III suppresses beta integrin-mediated invasive phenotypes and negatively correlates with metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* (2014) 35, 1258–1266.

## ***RESUME***

### **IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET SEQUENCAGE DES MOTIFS GLYCANNIQUES DES GLYCOPROTEINES DES CELLULES TUMORALES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET LEURS IMPLICATIONS DANS LA MIGRATION CELLULAIRE**

**Introduction :** L'étude des glycannes impliqués dans la biologie des glycoprotéines est un domaine d'extrême importance pour la compréhension de certains cancers, où les glycoprotéines et les structures glycaniques des cellules tumorales sont profondément modifiées.

**Objectifs :** - Mise au point de l'analyse des glycoprotéines par le dosage des oses constituant leur partie glycanique.

- Etude structurale des glycoprotéines et glycannes par spectrométrie de masse de l'intégrine  $\alpha3\beta1$ .

**Matériels et méthodes :** Des dosages des monosaccharides liés aux protéines ont été utilisés comme indicateurs sur les niveaux de glycoprotéines qui peuvent avoir une valeur diagnostique sur l'évolution de la maladie et l'apparition des métastases. Par conséquent, nous avons réalisé la mesure des mucoprotéines, le fucose et l'acide sialique dans le sérum pour estimer la concentration des glycoprotéines chez des populations saines et présentant des pathologies tumorales avec ou sans métastases. Afin de pouvoir caractériser les interactions entre les glycoprotéines et la matrice extracellulaire ou cellulaire qui sont impliqués dans la migration cellulaire et l'apparition de métastases nous avons orienté notre travail, sur l'analyse structurale des glycosylations portées par les glycoprotéines des cellules de carcinome de colon humaines (HT-29) et (SW-620) par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

**Résultats :** Par comparaison des concentrations des mucoprotéines, du fucose et de l'acide sialique, il a été constaté que les glycoprotéines sont anormalement exprimées dans les pathologies tumorales et surtout métastatiques. Le profil de glycosylation de l'intégrine  $\alpha3\beta1$  des cellules cancéreuses a montré la présence de structures de branchement et sialylés dans les cellules métastatiques, une fucosylation marquée, et la présence de résidus sulfatés dans les deux sous-unités de cette intégrine. Enfin, nos résultats suggèrent que l'intégrine  $\alpha3\beta1$  peut jouer un rôle dans la migration des cellules SW-620 par ses propriétés d'adhérence sur les protéines de la matrice extracellulaire.

**Conclusion :** Nous avons focalisé notre attention sur la quantification des glycoprotéines et la caractérisation de la micro-hétérogénéité des protéines N-glycosylées. La stratégie utilisée est basée

sur le dosage des mucoprotéines, du fucose, et de l'acide sialique pour l'évaluation des concentrations des glycoprotéines. Pour l'analyse de chaînes de glycannes, on a utilisé les ions diagnostiques issus de la fragmentation spécifique des N-glycannes pour obtenir la distribution des différentes glycoformes portées par un même peptide. Les techniques analytiques que nous avons utilisées dans notre travail apporteront, sans doute, une aide diagnostique, et pronostique aux cliniciens.

**Mots-clés :** Glycoprotéines, Spectrométrie de masse MALDI-TOF. Intégrine  $\alpha 3\beta 1$ , mucoprotéines sialylation, fucosylation.



## الملخص

### تحديد وتوصيف البيوكيميائية لجليكوبتروتينات وتسلسل أنماط في خلايا الورم بواسطة مطياف الكتلة وآثارها في هجرة الخلايا

**مقدمة:** دراس الجليكان المشارك في بيولوجيا البروتينات السكرية التي تعدوا ذات أهمية قصوى لفهم بعض أنواع اثارها في الخلايا السرطان، حيث يتم تحليل متساويات لجليكوبتروتينات في الدم بصرامة ودراسة البنى الجليكان للخلايا السرطانية.

**الأهداف:** - تطوير تحليل الجليكوبتروتينات عن طريق فحص السكريات الأحادية التي تشكل جزء الجليكان الخاص بها .

- دراسة هيكلية لجليكوبتروتينات و الجليكان بواسطة مطياف الكتلة لجليكوبتروتينات - $\alpha 3\beta 1$  integrin

**المواد والطرق:** تم استخدام المقاسات المرتبطة بالبروتين Monoscharide كمؤشرات لمستويات لجليكوبتروتينات والتي قد تكون هامة لتشخيص أمراض الاورم السرطانية وتطورها. لذلك تم إجراء قياس من fucose, mucoproteins، وحمض sialic في مصفوفة لتقدير تركيز لجليكوبتروتينات في مجموعة الأصحاء و مجموعة مرضى بالأورام السرطانية مع أو بدون ورم ثنائي. من أجل أن نكون قادرين على وصف التفاعل بين لجليكوبتروتينات والبروتينات المصفوفة خارج الخلية التي تشارك في هجرة الخلايا وظهور ورم ثنائي خبيث، قمنا بتوجيه عملنا على التحليل الهيكلي للغليكوسيلات التي يحملها لجليكوبتروتينات للخلايا السرطانية. القولون البشري (HT-29) و (SW-620) بواسطة مطياف الكتلة MALDI-TOF .

**النتائج:** من خلال المقارنة بين تركيزات mucoprotein ، fucose و حمض sialic ، فقد تم ثبوت تغيير جذري في مستويات الجليكوبتروتينات بشكل غير طبيعي في أمراض السرطانية وخاص اصحاب الاورام الثنائية. أظهر التحليل الخاص لجليكوبتروتينات  $\alpha 3\beta 1$  للخلايا السرطانية ارتفاع في نسبة تشعب هياكل متفرعة لوحدات جليكان و حمض sialic في الخلايا السرطانية ، و نسبة تغيير في fucosylation، ووجود بقايا مُكوّنة لوحدات فرعية sulfate في كلتا وحدات  $\alpha 3\beta 1$ Integrin. وأخيراً ، تشير نتائجنا إلى أن  $\alpha 3\beta 1$ -integrin قد يلعب دوراً في هجرة الخلايا SW-620 من خلال خصائص الالتصاق على بروتينات المصفوفة خارج الخلية .

**الخلاصة:** ركزنا اهتمامنا على المستويات الكمية من الجليكوبتروتينات وتوصيف عدم التجانس الجزئي لجليكوبتروتينات تستند الاستراتيجية المستخدمة على تحديد mucoproteins ، fucose ، وحمض sialic لتقييم تركيزات الجليكوبتروتينات. اما في ما يخص تحليل جليكان تم استخدام أيونات التشخيص الناتجة عن تجزئة محددة من جليكان للحصول على تشكيلات glycoforms المختلفة التي يحملها نفس لبروتين. التقنيات التحليلية التي تمكنا من القيام بها في عملنا ستقدم بلا شك مساعدة تشخيصية للأطباء

**كلمات البحث:** جليكوبتروتينات، مطياف الكتلة  $\alpha 3\beta 1$ intégrin ، MALDI-TOF ، mucoproteins ، حمض sialic ، fucosylation.

## ***ABSTRACT***

### **IDENTIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND SEQUENCING GLYCANNIC PATTERNS OF GLYCOPROTEINS IN TUMOR CELLS BY MASS SPECTROMETRY AND THEIR IMPLICATIONS IN CELL MIGRATION**

**Introduction:** The study of glycan involved in the biology of glycoproteins is an area of extreme importance for the understanding of certain cancers, where glycoprotein and glycan structures of tumor cells are deeply modified.

**Objectives:** - Development of the analysis of glycoprotein using quantification method for determination carbohydrate moieties monosaccharides constituted their glycan part.

- Structural study of glycoproteins and glycans by mass spectrometry of  $\alpha 3\beta 1$  integrin.

**Materials and Methods:** Carbohydrate unit protein-bound were used as indicators of glycoprotein levels that may be diagnostic of disease progression and metastasis. Therefore, the measurement of mucoproteins, fucose, and sialic acid in serum was performed to estimate glycoprotein concentration in healthy populations and tumoral setting with or without metastasis. In order to be able to characterize the interaction between the glycoprotein and the extracellular matrix proteins which are involved in cell migration and the appearance of metastasis, we have oriented our work on the structural analysis of the glycosylations carried by the glycoproteins of carcinoma cells Human colon (HT-29) and (SW-620) by MALDI-TOF mass spectrometry.

**Results:** By comparison of mucoprotein level, fucose and sialic acid, it has been shown that glycoproteins are abnormally expressed in tumoral and especially metastatic pathology. The glycosylation profile of the  $\alpha 3\beta 1$  integrin of cancer cells showed higher sialylation in metastatic cells, less fucosylation, the presence of branching structures and the presence of sulfated residues in both integrin subunits. Finally, our results suggest that the  $\alpha 3\beta 1$  integrin may play a role in the cell migration of SW-620 cells by its adhesion properties on extracellular matrix proteins

**Conclusion:** We focused our attention on the quantification of glycoproteins and the characterization of the micro-heterogeneity of N-glycosylated proteins. The strategy used is based on the determination of mucoproteins, fucose, and sialic acid for the evaluation of glycoprotein concentrations. For the analysis of chains of glycans, the diagnostic ions resulting from the specific fragmentation of the N-glycans were used to obtain the scattering of the different glycoforms carried by the same peptide. The analytical techniques that we have been able to carry out in our work will undoubtedly provide a diagnostic and prognostic aid to clinicians

**Keywords:** Glycoproteins, MALDI-TOF mass spectrometry. Integrin  $\alpha 3\beta 1$ , mucoproteins sialylation, fucosylation.

## RESUME

### IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET SEQUENCAGE DES MOTIFS GLYCANNIQUES DES GLYCOPROTEINES DES CELLULES TUMORALES PAR SPECTROPHOTOMETRIE DE MASSE ET LEURS IMPLICATIONS DANS LA MIGRATION CELLULAIRE

**Introduction :** L'étude des glycannes impliqués dans la biologie des glycoprotéines est un domaine d'extrême importance pour la compréhension de certains cancers, où les glycoprotéines et les structures glycanniques des cellules tumorales sont profondément modifiées.

**Objectifs :** - Mise au point de l'analyse des glycoprotéines par le dosage des oses constituant leur partie glycannique.

- Etude structurale des glycoprotéines et glycannes par spectrométrie de masse de l'intégrine  $\alpha\beta 1$ .

**Matériels et méthodes :** Des dosages des monosaccharides liés aux protéines ont été utilisés comme indicateurs sur les niveaux de glycoprotéines qui peuvent avoir une valeur diagnostique sur l'évolution de la maladie et l'apparition des métastases. Par conséquent, nous avons réalisé la mesure des mucoprotéines, le fucose et l'acide sialique dans le sérum pour estimer la concentration des glycoprotéines chez des populations saines et présentant des pathologies tumorales avec ou sans métastases. Afin de pouvoir caractériser les interactions entre les glycoprotéines et la matrice extracellulaire ou cellulaire qui sont impliqués dans la migration cellulaire et l'apparition de métastases nous avons orienté notre travail, sur l'analyse structurale des glycosylations portées par les glycoprotéines des cellules de carcinome de colon humaines (HT-29) et (SW-620) par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

**Résultats :** Par comparaison des concentrations des mucoprotéines, du fucose et de l'acide sialique, il a été constaté que les glycoprotéines sont anormalement exprimées dans les pathologies tumorales et surtout métastatiques. Le profil de glycosylation de l'intégrine  $\alpha\beta 1$  des cellules cancéreuses a montré la présence de structures de branchement et sialylés dans les cellules métastatiques, une fucosylation marquée, et la présence de résidus sulfatés dans les deux sous-unités de cette intégrine. Enfin, nos résultats suggèrent que l'intégrine  $\alpha\beta 1$  peut jouer un rôle dans la migration des cellules SW-620 par ses propriétés d'adhérence sur les protéines de la matrice extra cellulaire.

**Conclusion :** Nous avons focalisé notre attention sur la quantification des glycoprotéines et la caractérisation de la micro-hétérogénéité des protéines N-glycosylées. La stratégie utilisée est basée sur le dosage des mucoprotéines, du fucose, et de l'acide sialique pour l'évaluation des concentrations des glycoprotéines. Pour l'analyse de chaînes de glycannes, on a utilisé les ions diagnostiques issus de la fragmentation spécifique des N-glycannes pour obtenir la distribution des différentes glycoformes portées par un même peptide. Les techniques analytiques que nous avons utilisées dans notre travail apporteront, sans doute, une aide diagnostique, et pronostique aux cliniciens.

**Mots-clés :** Glycoprotéines, Spectrométrie de masse MALDI-TOF. Intégrine  $\alpha\beta 1$ , mucoprotéines sialylation, fucosylation.