

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse N° [33-2009]

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée par : **Benoît LAPORTE**

Le 1^{er} octobre 2009

Caractérisations génomique et fonctionnelle des gènes bovins

***ST6Gal II* et *fut7* ; implications dans la réponse inflammatoire**

Directeur de thèse : Dr. Jean-Michel PETIT

Jury :

Rapporteurs : **Philippe DELANNOY**, Professeur, Université de Lille 1
Rafael ORIOL, Directeur de Recherche CNRS, Villejuif

Examineurs : **Christelle BRETON**, Professeur, Université Grenoble 1
Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges
Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges
Jean-Michel PETIT, Maître de Conférences-HDR, Université de Limoges

De par leur localisation en périphérie des chaînes glycaniques, les acides sialiques sont impliqués dans de nombreux types d'interactions et de fonctions physiologiques. Leur transfert est assuré par une famille d'enzymes : les sialyltransférases. Nous décrivons ici le clonage et l'analyse fonctionnelle d'un deuxième gène bovin codant une β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase, *bST6Gal II*. Ce gène a une structure très proche de celles de ses homologues humain et murin, à savoir un découpage de la région codante en cinq exons. La sialyltransférase qu'il code utilise préférentiellement les oligosaccharides libres comme substrats accepteurs et son affinité pour le LacdiNAc est supérieure à celle qu'elle a pour le LacNAc. Le gène *bST6Gal II* a un profil d'expression tissulaire assez restreint et est principalement retrouvé au niveau du cerveau, du poumon, de la rate, du colon et de la glande mammaire. Trois transcrits ont été identifiés, l'un étant retrouvé dans tous les tissus où le gène s'exprime, les deux autres étant spécifiques du cerveau. Par ailleurs, nous démontrons que *bST6Gal II* est surexprimé *in vitro* dans des cellules épithéliales de glande mammaire stimulées par de l'IL-6. Ce gène jouerait donc un rôle au cours de la réponse inflammatoire, ce qui devra être confirmé *in vivo*.

Parallèlement à cela, nous avons identifié la fucosyltransférase bovine responsable de la biosynthèse de l'antigène Sialyl-Lewis^x. Cette enzyme, FUT7b, est une α 1,3-fucosyltransférase stricte qui utilise uniquement les oligosaccharides de type II sialylés comme substrat accepteur. Le gène qui la code présente 80% d'identité avec son homologue humain et est constitué de deux exons. *fut7b* s'exprime principalement dans les organes lymphoïdes tels que le thymus et la rate mais a également été retrouvé dans le foie et de façon surprenante dans le poumon. Enfin, alors que le gène humain est très peu polymorphe, nous avons identifié dans un faible panel d'animaux 3 SNPs faux sens dont l'un d'entre eux, situé dans la séquence codant le domaine catalytique, pourrait inactiver l'enzyme.

Genomic and functional characterization of *ST6Gal II* and *fut7* bovine genes; involvement in the inflammatory response

Because of their position at the very end of glycan chains, sialic acids are involved in many types of interactions and physiological functions. Their transfer is catalyzed by a family of enzyme named sialyltransferases. We describe here the molecular cloning and the functional analysis of a second bovine gene encoding a β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase, *bSTGal II*. The gene's shape is very similar to its human and mouse counterparts, and is made of five coding exons. The encoded sialyltransferase use preferentially free oligosaccharides and has a better affinity for LacdiNAc than for LacNAc. *bST6Gal II* gene expression pattern is quiet restrictive and the gene is mainly expressed in brain, lung, spleen, colon and mammary gland. Among the three identified transcripts, one is found in all the tissues expressing the gene while the two others are brain specific. In addition, we demonstrate that *bST6Gal II* is upregulated in mammary epithelial cells during an IL-6 treatment. Thus, the gene should be involved in the inflammatory response but this result has to be confirmed *in vivo*.

Concurrently, we have identified the bovine fucosyltransferase that is responsible of the Sialyl-Lewis^x biosynthesis. This enzyme, FUT7b, is a strict α 1,3-fucosyltransferase that only uses sialylated type II oligosaccharides. The gene presents 80% of identity with its human counterpart and is constituted by two exons. *fut7b* is mainly expressed in lymphoid tissues such as thymus and spleen but was also detected in liver and surprisingly in lung. Finally, while the human gene has little polymorphism, we identified in a weak panel of cattles 3 missense SNPs and one of them, located in the catalytic domain coding region, could inactivate the enzyme.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique

Ara : arabinose **ARN** : Acide Ribonucléique

ASGP-R : Asialoglycoprotein Receptor

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BCR : B-Cell Receptor

BiP : Binding Protein

BTA : *Bos Taurus* autosomal

CAZy : Carbohydrate Active enZyme

CDC: Complement-dependent cell-mediated cytotoxicity

CDG : Congenital Disorder of Glycosylation

CMP : cytidine monophosphate

CMV : cytomegalovirus

CNX: Calnexine

COS 1 : cellule d'ovaire de singe vert

COX : cyclo-oxygénase

CRD: Cystein Rich Domain

CRT: Calréticuline

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

Dol: dolichol

ERAD : ER-associated degradation pathway

ESL : E-selectin-ligand

Fuc : fucose

GAG : Glycosaminoglycane

Gal : galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphatedéshydrogénase

GDP : guanidine diphosphate

G_D : ganglioside disialylé

Glc : glucose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GlcUA : acide glucuronique

G_M : ganglioside monosialylé

Grp : Glucose regulated protein

G_Q : ganglioside pentasialylé

G_T : ganglioside tetrasialylé

Hsp : Heat shock protein

EGF : Epidermal Growth Factor

ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment

ES : Embryonic Stem

GlyCAM : Glycosylation-dependent cell adhesion molecule

HepG2 : lignée cellulaire d'hépatocarcinome

HSA : *Homo sapiens* autosomal

GnT : N-acétylglucosamine transférase

ICAM : intercellular adhesion molecule

IdUA : acide iduronique

IGFBP-6 : Insulin-like growth factor binding protein-6

IL : Interleukine

LacNAc : N-acétyllactosamine

LacdiNAc : di-N-acétyllactosamine

LAD: *Leukocyte adhesion* deficiency

Le : antigène Lewis

MAA : *maackia amurensis* agglutinin

MadCAM : Mucosal addressin cell adhesion molecule

Man : mannose

MCS : Multi Cloning Site

Xyl: xylose

MEB :Muscle Eye Brain disease

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MT1-MMP : Membrane Type-1 Matrix MetalloProteinase

NCAM : Neural cell adhesion molecule

Neu5Ac : acide 5-N-acétylneuraminique

Neu5Gc : acide 5-N-glycolylneuraminique

NF : Nuclear Factor

OGT: O-glucosyltransférase

ORF : open reading frame

OST : oligosaccharyltransférase

PDI : Protein disulfide isomerase

Pofut1: protéine-O-fucosyltransférase

POMT: Protéine-O-Mannosyltransférase

ppGaNTase : peptidyl GalNAc Transferase

PSA : poly sialic acids

PSGL : P-selectin glycoprotein ligand

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends

Sia : acide sialique

SLe : antigène Sialyl Lewis

SNA : *Sambucus nigra* agglutinin

RE : réticulum endoplasmique

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

TNF α : Tumor Necrosis Factor

TSR : Thrombospondin type I Repeat

UDP : uridine diphosphate

UTR : Untranslated region

VIP(L) : vesicular-integral membrane protein (like)

WGS : Whole Genome Shotgun

WWS : Walker Warburg Syndrom

SOMMAIRE

Avant-propos	19
Exposé bibliographique	25
1. La glycosylation : une modification post-traductionnelle essentielle.	27
1.1. La O-glycosylation	28
1.1.1. La O-glycosylation de type mucine.....	28
1.1.2. Les O-glycannes de type GAG.....	33
1.1.3. La O-mannosylation	35
1.1.4. La O-fucosylation.....	36
1.1.5. La O-glycosylation	39
1.1.6. La O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation).....	39
1.1.7. Implications physiologiques de la O-glycosylation	40
1.2. La N-glycosylation.....	42
1.2.1. Biosynthèse des N-glycannes	42
1.2.1.1. Dans le réticulum endoplasmique	43
1.2.1.2. Dans l'appareil de Golgi	45
1.2.2. Structures et diversité des N-glycannes.....	47
1.2.3. Fonctions biologiques des N-glycannes	49
1.2.3.1. Contrôle qualité de la structure tridimensionnelle des N-glycoprotéines	50
1.2.3.2. Maintien de la structure de la protéine	52
1.2.3.3. L'adressage des protéines	53
1.2.3.4. Interactions cellule-matrice et cellule-cellule	54
1.2.3.5. Pathologies associées aux N-glycannes	56
2. L'épitope Sialyl- α 2,6-lactosamine : biosynthèse et rôles physiologiques	58
2.1. Les sialyltransférases	58
2.1.1. Structure moléculaire des sialyltransférases.....	60
2.1.2. CMP-Sia... un substrat donneur unique ?.....	62
2.1.2.1. Biosynthèse du substrat donneur CMP-Sia	63
2.1.2.2. Pourquoi avoir une telle diversité structurale ?	65
2.1.3. La famille des ST3Gals	66
2.1.4. La famille des ST6Gals	69
2.1.5. La famille des ST6GalNAcs.....	70
2.1.6. La famille des ST8Sias.....	73
2.2. L'épitope Sialyl- α 2,6-lactosamine.....	76
2.2.1. Les ST6Gals ou β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases.....	76
2.2.1.1. Spécificité de substrat et organisation protéique	76
2.2.1.2. Organisation génomique des β-galactoside-α2,6-sialyltransférases	79

2.2.2.	Fonctions physiologiques associées au motif Sialyl- α 2,6-lactosamine	83
2.2.2.1.	<i>La clairance des glycoprotéines sériques</i>	83
2.2.2.2.	<i>Sia₆LacNAc et cancer</i>	84
2.2.2.3.	<i>Sia₆LacNAc, le ligand du CD22</i>	85
2.2.2.4.	<i>Sia₆LacNAc et réponse inflammatoire</i>	86
3.	L'antigène Sialyl-Lewis ^x : un antigène tissulaire essentiel pour l'adhésion cellulaire	88
3.1.	Les fucosyltransférases.	88
3.1.1.	Le GDP-Fucose	90
3.1.2.	Les α 1,6-fucosyltransférases	91
3.1.2.1.	<i>Organisation protéique</i>	92
3.1.2.2.	<i>Structure du gène FUT8</i>	92
3.1.2.3.	<i>Rôles associés à l'α1,6-fucosylation</i>	93
3.1.3.	Les α 1,2-fucosyltransférases	94
3.1.3.1.	<i>Les gènes FUT1, FUT2, Sec1</i>	95
3.1.3.2.	<i>Les fucosyltransférases H et Sécréteur</i>	95
3.1.3.3.	<i>Fonctions associées à l'α1,2-fucosylation</i>	96
3.1.4.	Les α 1,3/4-fucosyltransférases	96
3.1.4.1.	<i>Les bases moléculaires du transfert du fucose en α1,3 et α1,4</i>	97
3.1.4.2.	<i>Spécificité de substrat des α3/4-fucosyltransférases</i>	98
3.1.4.3.	<i>Organisation génomique des α1,3/4-fucosyltransférases</i>	99
3.2.	Fonctions des antigènes tissulaires de type Lewis	103
3.2.1.	L'adhésion cellulaire	103
3.2.2.	Sensibilité aux agents infectieux	106
3.2.3.	Antigènes Lewis et cancer	106
3.2.4.	Les antigènes Lewis comme molécules thérapeutiques	107
	Positionnement du sujet	109
	Matériels et méthodes	113
1.	Matériels	115
2.	Méthodes	115
2.1.	Techniques de bases de biologie moléculaire	115
2.1.1.	Extraction et analyse des ARN totaux	115
2.1.2.	Synthèse du premier brin d'ADNc	116
2.1.3.	Séquençage des échantillons d'ADN	117
2.2.	Clonage et analyse génétique	117
2.2.1.	Clonage moléculaire de l'ORF du gène <i>ST6Gal II</i> bovin	117
2.2.2.	Amplification des introns du gène <i>bST6Gal II</i>	119

2.2.3.	Analyse des régions 5'-UTR des ARNm du gène <i>bST6Gal II</i>	120
2.2.4.	Identification de la séquence codante du gène <i>fut7</i> bovin.....	121
2.2.5.	Expression tissulaire des gènes <i>bST6Gal II</i> et <i>fut7</i>	122
2.2.6.	Amplification de l'ORF et de la séquence intronique de <i>fut7</i> bovin.....	123
2.2.7.	Etude du niveau d'expression des gènes <i>ST6Gal I/II</i> et <i>ST3Gal III/IV</i> par RT-PCR quantitative en temps réel	124
2.2.8.	Construction de vecteurs d'expression dans les cellules eucaryotes.....	124
2.3.	Culture cellulaire	125
2.3.1.	Les cellules COS 1	125
2.3.1.1.	<i>Conservation des cellules</i>	125
2.3.1.2.	<i>Mise en culture des cellules après décongélation</i>	126
2.3.1.3.	<i>Entretien des cultures cellulaires</i>	126
2.3.1.4.	<i>Transfection transitoire des cellules COS-1</i>	126
2.3.2.	Les cellules épithéliales de glande mammaire bovine	127
2.3.2.1.	<i>Mise en culture et entretien des cellules</i>	127
2.3.2.2.	<i>Induction in vitro de la réponse inflammatoire</i>	128
2.3.3.	Culture bactérienne.....	128
2.3.3.1.	<i>Préparation de bactéries compétentes</i>	129
2.3.3.2.	<i>Transformation des cellules compétentes</i>	129
2.4.	Analyses biochimiques	130
2.4.1.	Migration des protéines en gel de poly-acrylamide	130
2.4.2.	Transfert sur membrane.....	130
2.4.3.	Lectinoblot et révélation	130
2.4.4.	Activité enzymatique des glycosyltransférases.....	131
2.4.5.	Purification des oligosaccharides du lait.....	132
2.4.5.1.	<i>Préparation des échantillons de lait</i>	132
2.4.5.2.	<i>Chromatographie échangeuse d'anions</i>	132
2.4.5.3.	<i>Chromatographie gel-filtration</i>	133
2.4.5.4.	<i>Chromatographie échangeuse de cations</i>	133
2.4.5.5.	<i>Chromatographie couche mince</i>	133
2.4.5.6.	<i>Perméthylation des oligosaccharides</i>	134

Résultats et discussion 135

1.	<i>bST6Gal II</i> , un gène codant une seconde β -Galactoside α 2,6 sialyltransférase bovine, ST6Gal II, impliquée au cours de la réponse inflammatoire	137
1.1.	Clonage moléculaire d'un ADNc codant pour <i>bST6Gal II</i> et organisation génique	138
1.1.1.	Clonage moléculaire d'un ADNc de <i>bST6Gal II</i>	138
1.1.2.	Structure du gène <i>ST6Gal II</i> et de son produit	139

1.1.2.1. <i>Le cadre ouvert de lecture</i>	139
1.1.2.2. <i>Les structures introniques</i>	139
1.1.2.3. <i>Analyse comparative de la structure de bST6Gal II par rapport à celles de bST6Gal I et hST6Gal II</i>	141
1.1.2.4. <i>La protéine bST6Gal II</i>	143
1.2. Expression tissulaire du gène.....	145
1.3. Analyse des régions 5' non traduites des ARNm de <i>bST6Gal II</i> . Organisation et distribution tissulaire.....	147
1.4. Analyse de la spécificité de substrat de formes recombinantes de bST6Gal II.....	150
1.5. Effets des interleukines IL-1, IL-6 et TNF α sur l'expression des gènes <i>bST6Gal I</i> et <i>bST6Gal II</i> dans les cellules bovines de glande mammaire.....	153
1.5.1. Au niveau transcriptionnel	154
1.5.1.1. <i>Après stimulation des cellules avec de l'IL-1</i>	154
1.5.1.2. <i>Après stimulation des cellules avec du TNFα</i>	155
1.5.1.3. <i>Après stimulation des cellules avec de l'IL-6</i>	158
1.5.1.4. <i>Expression des ST3Gals des cellules traitées à l'IL6</i>	159
1.5.2. Au niveau protéique	160
1.6. Discussion.....	162
1.6.1. La famille des β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases.....	162
1.6.2. Analyse du gène <i>ST6Gal II</i> bovin et de son produit.....	163
1.6.3. Activité enzymatique de l'enzyme bST6Gal II.....	164
1.6.4. Expression tissulaire de <i>bST6Gal II</i>	166
1.6.5. <i>bST6Gal II</i> , un gène impliqué dans la réponse inflammatoire.....	168
2. <i>FUT7</i> code une α 1,3-fucosyltransférase qui catalyse la biosynthèse de l'épitope Sialyl-Lewis ^x chez le bovin	175
2.1. Clonage d'un ADNc codant pour la FUT7 bovine.....	176
2.2. Le gène <i>fut7b</i>	178
2.2.1. Organisation génomique.....	178
2.2.2. Localisation chromosomique	180
2.2.3. La protéine FUT7 bovine	182
2.3. Expression tissulaire du gène <i>fut7b</i>	184
2.4. Spécificité de substrat de FUT7 bovine.....	185
2.5. Etude du polymorphisme de <i>fut7b</i>	186
2.6. Discussion.....	188
2.6.1. Analyse du gène <i>fut7b</i>	188
2.6.2. Propriétés enzymatiques de FUT7b	189
2.6.3. Expression tissulaire du gène <i>fut7b</i>	190
2.6.4. Analyse polymorphique du gène.....	191

3. Implication des oligosaccharides du lait dans la résistance aux agents infectieux chez les ruminants laitiers.....	193
3.1. Purification des oligosaccharides libres des échantillons de lait.....	194
3.2. Séparation du lactose des autres oligosaccharides.....	195
3.3. Séparation des fractions oligosaccharidiques neutres et acides.....	197
3.4. Etude structurale des oligosaccharides libres du lait de brebis.....	199
3.5. Conclusion	201
<i>Conclusion et perspectives</i>	203
<i>Bibliographie</i>	209

Index des Figures

- Figure 1 :** Les différents monosaccharides engagés dans une liaison de type *O*-glycosidique sur des résidus de Sérine (S), de Thréonine (T), de Tyrosine (Y), d'hydroxyproline (HyP) ou d'hydroxylysine (HyK).
- Figure 2 :** Représentation schématique d'une mucine.
- Figure 3 :** Les différents noyaux ou « core » des *O*-glycannes de type mucine.
- Figure 4 :** Les chaînes polylactosaminiques constituant le squelette des *O*-glycannes
- Figure 5 :** Exemples de structures périphériques retrouvées sur les *O*-glycannes et impliqués dans le déterminisme des groupes sanguins.
- Figure 6 :** Représentation schématique d'un protéoglycane de type chondroïtine, dermatane et héparane sulfate.
- Figure 7 :** Représentation schématique d'un *O*-mannosylglycane
- Figure 8 :** Représentation schématique des motifs EGF et TSR.
- Figure 9 :** Représentation de *O*-fucosylglycannes
- Figure 10 :** Le glycane précurseur du noyau des *N*-glycannes.
- Figure 11 :** La maturation des *N*-glycannes dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi
- Figure 12 :** Les trois différents types de *N*-glycannes présents chez les eucaryotes
- Figure 13 :** Les différentes structures pouvant être présentes au niveau des *N*-glycannes de type complexe.
- Figure 14 :** Mise en conformation des protéines *N*-glycosylées au cours du cycle de la Calnexine (CNX) et de la Calréticuline (CRT).
- Figure 15 :** Les réactions de glycosylation catalysées par GnT-III, GnT-V et FUT8.
- Figure 16 :** Relation entre les manifestations cliniques et l'état d'élongation des *N*-glycannes chez des patients atteints de CDG.
- Figure 17 :** Représentation schématique de l'organisation générale des sialyltransférases.
- Figure 18 :** Les motifs conservés des sialyltransférases humaines.
- Figure 19 :** Les principaux acides sialiques retrouvés chez les mammifères, l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolyneuraminique (Neu5Gc).
- Figure 20 :** Voie de biosynthèse *de novo* de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac).
- Figure 21 :** Effets de la modification structurale des acides sialiques sur leur reconnaissance par des lectines endogènes/exogènes.
- Figure 22 :** Les motifs spécifiques de la sous-famille des ST3Gals.
- Figure 23 :** Représentation des structures génomiques des ST3Gals chez la souris.
- Figure 24 :** Motifs spécifiques de chacune des deux sous-familles de ST6GalNAc.
- Figure 25 :** Représentation schématique des gènes codant les ST6GalNAcs murines.

Figure 26 : Les motifs spécifiques des ST8Sias.

Figure 27 : Les motifs spécifiques des polysialyltransférases ST8Sia II, III et IV.

Figure 28 : Représentation schématique des gènes codant les ST8Sias murines.

Figure 29 : Comparaison des structures protéiques des ST6Gals humaines.

Figure 30 : Motifs spécifiques des ST6Gals.

Figure 31 : Représentation schématique des transcrits majoritaires de *ST6Gal I* chez l'homme, la souris, le rat et le bovin.

Figure 32 : Représentation schématique des transcrits connus de *hST6Gal II*.

Figure 33 : Représentation des structures génomiques des ST6Gals chez la souris.

Figure 34 : La voie de dégradation des glycoprotéines sériques par les cellules hépatiques.

Figure 35 : Les interactions de CD22 avec ces différents ligands.

Figure 36 : Les sites de fucosylation des α 1,2, α 1,3/4 et α 1,6-fucosyltransférases chez l'homme.

Figure 37 : Les voies de biosynthèse du GDP-Fucose.

Figure 38 : Réaction enzymatique catalysée par l' α 1,6-FucTf.

Figure 39 : Représentation schématique de la structure de l' α 1,6-Fucosyltransférase.

Figure 40 : Comparaison de la répartition exon/intron des gènes *FUT8* (A) bovin et (B) humain.

Figure 41 : Les antigènes de groupes sanguins du système ABH (O) retrouvés sur les *O*- et les *N*-glycannes.

Figure 42 : Biosynthèse des antigènes tissulaires de type Lewis.

Figure 43 : Représentation schématique des α 1,3/4-fucosyltransférases humaines.

Figure 44 : Organisation génomique du cluster de gènes humains *FUT3-FUT5-FUT6* et du gène bovin *futb*.

Figure 45 : Représentation schématique du gène *FUT4* humain.

Figure 46 : Représentation schématique du gène *FUT7* humain.

Figure 47 : Représentation schématique des gènes *FUT10* et *FUT11* humains.

Figure 48 : Représentation schématique du recrutement leucocytaire au site inflammatoire.

Figure 49 : Les ligands glycaniques des sélectines.

Figure 50 : Représentation schématique de la technique de 5' RACE.

Figure 51 : Carte génétique des vecteurs d'expression pFlag-CMV-1 et 2.

Figure 52 : Représentation schématique du protocole d'analyse de la réponse inflammatoire dans les cellules de glandes mammaires bovines en culture primaire.

Figure 53: Organisation génique de *ST6Gal II* bovin.

Figure 54 : Comparaison des organisations géniques des régions codantes de *bST6Gal II* (A), *hST6Gal II* (B) et *bST6Gal I* (C).

- Figure 55** : Profil d'hydrophatie de la ST6Gal II bovine.
- Figure 56** : Alignements des séquences protéiques putatives des ST6Gal II murine, de rat, humaine et bovine.
- Figure 57** : Profil d'expression tissulaire du gène *bST6Gal II*.
- Figure 58** : Recherche de transcrits alternatifs dans la région codante de *ST6Gal II* durant la transcription.
- Figure 59** : Les différentes régions 5' non traduites des ARNm du gène *bST6Gal II*.
- Figure 60** : Représentation schématique des 2 régions promotrices de *bST6Gal II*.
- Figure 61** : Cellules épithéliales de glande mammaire bovine en culture primaire.
- Figure 62** : Effet des traitements aux Interleukines 1 et 6 et au TNF α sur l'expression relative des gènes *ST6Gal I*, *ST6Gal II* et *COX2* dans des cellules épithéliales de glande mammaire bovine.
- Figure 63** : Effet du traitement à l'Interleukine 6 sur le niveau d'expression relatif des gènes *ST3Gal III* et *ST3Gal IV* dans les cellules épithéliales de glande mammaire bovine.
- Figure 64**: Incidence du traitement à l'IL-6 sur le profil de sialylation des glycoprotéines des cellules épithéliales de glande mammaire.
- Figure 65** : Organisation génique des parties 5' non codantes de *bST6Gal I* (A) et de *bST6Gal II* (B) et de *hST6Gal II* (C).
- Figure 66** : Représentation schématique des interactions hôtes-pathogène et de la réponse cellulaire qui s'en suit.
- Figure 67** : Rôle potentiel de ST6Gal II dans la réponse inflammatoire.
- Figure 68** : Rapport de la quantité relative des transcrits de *bST6Gal I* par rapport à celle des transcrits de *ST6Gal II* dans les cellules épithéliales de glande mammaire bovine.
- Figure 69** : Les QTLs associés à la réponse inflammatoire du chromosome 11.
- Figure 70** : Amplification de la séquence codante 3' codante du gène *fut7* bovin.
- Figure 71** : Clonage de la région codante du gène *fut7* bovin.
- Figure 72** : Structure du gène *fut7* bovin.
- Figure 73** : Comparaison des organisations génomiques de *fut7* bovin (A), *FUT7* humain (B) et *fut7* murin (C).
- Figure 74** : Analyse des groupes de syntenie du chromosome 9 humain (HSA9) par rapport au génome bovin.
- Figure 75** : Analyse du profil d'hydrophatie de FUT7.
- Figure 76** : Alignements des séquences protéiques putatives des FUT7 bovine, humaine et murine.
- Figure 77** : Profil d'expression tissulaire du gène *fut7b*.
- Figure 78** : Analyse des oligosaccharides libres du lait de brebis.
- Figure 79** : Chromatographie sur couche mince des oligosaccharides du lait de brebis en sortie de colonne gel-filtration P4.
- Figure 80** : Chromatographie couche mince de la fraction B de l'échantillon 40078 après regroupement des tubes 29 à 49.
- Figure 81** : Chromatographie couche mince des fractions oligosaccharidiques neutres et acides du lait de brebis.

Figure 82 : Analyse comparative en chromatographie couche mince des fractions oligosaccharidiques du lait de brebis entre une population présentant un taux élevé de leucocytes (40218) et une population présentant un taux faible de leucocytes (40078).

Index des Tableaux

Tableau I : Structure et degré de sulfatation des différents types de glycosaminoglycannes (GAG).

Tableau II : Classification des sialyltransférases.

Tableau III : Comparaison des spécificités de substrats de hST6Gal I et II.

Tableau IV : Amorces et couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés pour l'étude de *ST6Gal II*.

Tableau V : Amorces oligonucléotidiques utilisés pour l'étude de *fut7*

Tableau VI : Comparaison des séquences exoniques codantes de *bST6Gal II* avec celles de *bST6Gal I* et *hST6Gal II*

Tableau VII: Activité relative des formes membranaires et solubles de ST6Gal II bovines recombinantes.

Tableau VIII : Km des formes recombinantes bovines de ST6Gal II pour le LacNAc et le LacdiNAc.

Tableau IX : Activité des α 3-fucosyltransférases bovines recombinantes FUT7b, FUT4b* et FUT9b* produites dans les cellules COS-1.

Tableau X : Liste des différents fragments amplifiés pour la recherche de polymorphismes de *fut7b*.

Tableau XI : Les différents SNPs de la séquence codante de *fut7b*.

Tableau XII : Identification des fractions oligosaccharidiques A, B et C en sortie de chromatographie gel-filtration P4 dans les différents échantillons de lait de brebis.

Tableau XIII : Identification des fractions oligosaccharidiques neutres et acides en sortie de chromatographie d'échange de cations.

Tableau XIV : Structure des oligosaccharides libres du lait de brebis.

AVANT-PROPOS

L'étude des glucides a débuté au cours du XIX^{ème} siècle par la découverte de la glycolyse. Mais l'identification de la structure du D-glucose par Fisher en 1891 marque vraiment le début de la recherche sur la chimie et la biochimie des glucides.

Durant de très nombreuses années, les glucides étaient considérés comme de simples réserves énergétiques, les molécules porteuses d'une information biologique se restreignant aux acides nucléiques et aux protéines. L'identification de structures glucidiques associées aux protéines et aux lipides, nommées « glycoconjugués », a suscité de part leur diversité l'intérêt de nombreuses équipes à travers le monde. Ainsi, beaucoup de fonctions physiologiques associées à ces glycannes ont pu être mises en évidence. Ces structures interviennent au cours de la fécondation (Jego *et al.*, 1980), du développement (Hao *et al.*, 2008), de la différenciation cellulaire (Liu *et al.*, 1981), de l'adhésion cellulaire (Lowe *et al.*, 1990), et elles jouent un rôle majeur lors de la domiciliation lymphocytaire au site inflammatoire. Elles participent également à l'adressage intra et extra-cellulaire des glycoprotéines (Jadot *et al.*, 1999) et certains motifs glucidiques sont des déterminants de groupes sanguins (Kabat, 1956). Les glycannes sont retrouvés des eucaryotes supérieurs aux organismes inférieurs (bactéries, champignons) et présentent une diversité structurale immense dont le répertoire ne cesse de s'enrichir.

Ces nombreuses découvertes ont amené à la création d'une nouvelle discipline exclusivement dédiée à l'étude des glucides par Rademacher, Parekh et Dwek : la glycobiologie (Rademacher *et al.*, 1988). Elle englobe les études biochimiques et structurales des glucides, les analyses fonctionnelles associées aux glycannes, mais aussi l'identification de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse de ces oses.

Les mécanismes de la biosynthèse des structures glycaniques sont loin d'être résolus. En effet, alors que ceux de la réplique de l'ADN et de la synthèse des protéines sont respectivement basés sur la copie et « l'interprétation » d'une matrice, celle des glycannes semble être due à l'action

séquentielle de toute une batterie d'enzymes présentes dans le cytosol des cellules procaryotes (elles ne seront pas traitées dans ce mémoire), dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le cytosol des cellules eucaryotes. Ces enzymes regroupent des glycosyltransférases, des glycosidases mais aussi des transporteurs de glycosyl-nucléotides (Kleene et Berger, 1993). Dans l'état actuel des connaissances, il y aurait environ un millier de gènes qui codent ces enzymes, gènes répertoriés dans la base de données CAZy (<http://www.cazy.org/>). Bien que certaines étapes de la biosynthèse des glycanes soient correctement décrites, notamment celles de l'initiation de la *N*-glycosylation, de vastes zones d'ombres persistent. En effet, la grande diversité structurale des glycoconjugués laisse sous entendre l'existence par analogie au code génétique, d'un « glycode », qui est encore loin d'avoir livré tous ses secrets. La seule information dont nous disposons aujourd'hui est le fait que la localisation subcellulaire des enzymes de la glycosylation joue un rôle important dans la définition des différents épitopes glucidiques.

Tout autant que pour leur biosynthèse, beaucoup de choses restent à découvrir quant aux fonctions biologiques associées aux glycanes portés par les lipides et les protéines. Pour ces dernières, bien qu'elle soit une modification post-traductionnelle, la glycosylation module leur fonction mais permet aussi leur adressage vers les différents compartiments cellulaires ou le milieu extracellulaire et participe à leur mise en conformation. Bien souvent, les propriétés physiologiques des glycoconjugués sont dues aux monosaccharides situés en position terminale des antennes glycaniques tels que le galactose, la *N*-acétylgalactosamine, le fucose et l'acide sialique. Ces deux derniers monosaccharides sont notamment impliqués à différents stades du développement et lors des réponses inflammatoires et immunitaires.

Fort de ces informations, j'ai intégré en 2004 l'équipe Glycogénome de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UMR INRA 1061/Université de Limoges) dans le cadre de ma formation doctorale. Depuis 1995, une des thématiques de cette unité est l'étude des gènes bovins de glycosyltransférases et de leurs produits (Oulmouden *et al.*, 1997 ; Mercier *et al.*, 1999, Loriol *et al.*, 2006) tout en s'intéressant aussi à la phylogénie des glycosyltransférases (Javaud *et al.*, 2000 ; Loriol *et al.*, 2006 ; Petit *et al.*, 2006). Désormais, l'objectif principal de l'équipe réside dans la détermination des fonctions physiologiques et/ou physiopathologiques associées aux produits des glycosyltransférases, et plus particulièrement des structures formées par les fucosyl- et sialyltransférases. Cette recherche concerne l'étude de processus développementaux comme la

myogénèse (Loriol *et al.*, 2006), ou de processus pathologiques comme les maladies à prions (Barret *et al.*, 2005).

Notre unité s'intègre dans le département de génétique animale de l'INRA qui porte un intérêt tout particulier à la sélection des animaux d'élevage. L'un des enjeux majeurs de cette sélection concerne les ruminants laitiers. En effet ces animaux sont enclins à une pathologie très fréquente, la mammite, qui affecte la production de lait et la rend impropre à la consommation ce qui représente une perte financière conséquente pour l'éleveur. De nombreuses études ont montré que les structures glycaniques jouaient un rôle primordial lors des processus infectieux et de leurs « réparations » (Lowe *et al.*, 1993 ; Gagneux et Varki, 1999, Lowe, 2003). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes impliquant la glycosylation au cours des réponses immunitaires et inflammatoires s'avérerait essentielle pour de futures études de variabilité génétique ayant pour but de sélectionner des animaux présentant une résistance à certaines pathologies.

C'est donc dans ce contexte que je me suis engagé, sous la direction de Jean-Michel Petit, à participer à l'amélioration de nos connaissances sur le rôle joué par certaines structures glycaniques durant la réponse inflammatoire, et des enzymes responsables de leurs biosynthèses. En l'occurrence, nous nous sommes intéressés au gène codant l'enzyme FUT7 responsable de la biosynthèse de l'antigène Sialyl-Lewis^x, épitope glucidique primordial lors de l'étape de roulement de la domiciliation lymphocytaire (Lowe, 2003). Nous nous sommes également attachés à étudier un gène dont le produit est impliqué dans la biosynthèse de l'épitope Sialyl- α 2,6-lactosamine, ce dernier ayant un rôle très important dans les interactions hôte-pathogène (Karlsson, 1995 ; Gagneux et Varki, 1999) et dans l'activation des lymphocytes B (Collins *et al.*, 2002). L'ultime étape de sa biosynthèse est effectuée par une famille de sialyltransférases : les β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases.

Dans les deux cas, la stratégie employée a été la même et s'est déroulée de la façon suivante. Nous avons commencé par le clonage des parties codantes de chacun des gènes impliqués (*fut7* et *ST6Gal II*). Par la suite, nous avons analysé les profils d'expression tissulaire pour chacun de ces deux gènes et recherché la présence de différents transcrits. L'étape suivante a consisté à la construction de vecteurs d'expression afin de produire ces enzymes sous forme recombinante, et ce, dans le but d'en déterminer les propriétés enzymatiques. Enfin, nous avons analysé les variations du niveau d'expression de ces gènes lors de la reproduction *in vitro* de conditions inflammatoires.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La glycosylation : une modification post-traductionnelle essentielle.

La glycosylation est l'une des modifications post-traductionnelles des plus courantes des protéines mais également l'une des plus complexes. Très largement répandue dans le monde vivant, elle est tout autant observée chez les eucaryotes (levures, plantes, animaux) que chez les procaryotes. En effet, de récentes études révèlent la présence de glycoprotéines chez des bactéries pathogènes telle que *Helicobacter pylori* (Hooper et Gordon, 2001). Du fait de cette très large représentation dans le monde vivant, les chaînes glucidiques associées aux protéines, autrement appelées glycannes, présentent une très grande diversité structurale.

Dans ce manuscrit, nous restreindrons notre étude de la glycosylation aux cellules eucaryotes animales. Les glycoprotéines de ces cellules sont retrouvées principalement dans les compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les lysosomes, la membrane plasmique et peuvent être également sécrétées dans le milieu extra cellulaire. De ce fait, elles assurent autant la fonction d'enzyme que celle de protéines de structure ou d'épitope antigénique.

La classification de ces glycoprotéines s'établit en fonction du type de liaison reliant le glycanne à la partie protéique. Ainsi, il en résulte deux catégories principales de glycoprotéines : les *N*-glycoprotéines et les *O*-glycoprotéines. Dans le cas des *N*-glycoprotéines, la liaison de l'ose sur la protéine s'effectue au niveau de l'atome d'azote porté par la chaîne latérale d'une asparagine contenue dans le motif consensus N-X-S/T (où X représente tous les acides aminés exceptée la proline) (Gavel et Heinje, 1990). Pour les *O*-glycoprotéines, le glycanne est attaché à la partie peptidique au niveau de l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine. Actuellement, aucune séquence consensus n'a été décrite à l'exception de la *O*-fucosylation (Shao et Haltiwanger, 2003) et de la *O*-glucosylation (Moloney *et al.*, 2000). De plus, certaines glycoprotéines peuvent porter à la fois *N* et *O*-glycannes. Il existe également d'autres types de glycosylation. Il semblerait que 30% des protéines soit également *C*-glycosylées (Vliegenthart et Cassel, 1998). Elles présentent alors un résidu de mannose lié sur un des carbones de l'hétérocycle du tryptophane mais le rôle de cette glycosylation reste inconnu.

1.1. La O-glycosylation

La biosynthèse des O-glycannes peut s'initier au niveau du réticulum endoplasmique mais se fera essentiellement dans l'appareil de Golgi. Quoiqu'il en soit, elle commence systématiquement par l'ajout d'un monosaccharide sur une sérine ou une thréonine, et ce même s'il existe quelques exceptions dont celle du collagène pour lequel des O-glycannes sont portés par une hydroxyproline ou une hydroxylysine (Yamauchi *et al.*, 1982), ou celle de la glycopéline pour laquelle le glycanne est fixé sur une tyrosine (Cao *et al.* 1993). La nature du premier monosaccharide dépend de l'acide aminé sur lequel la liaison s'effectue, les monosaccharides principalement retrouvés étant la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine, le fucose, le xylose, le galactose et le glucose (Figure 1).

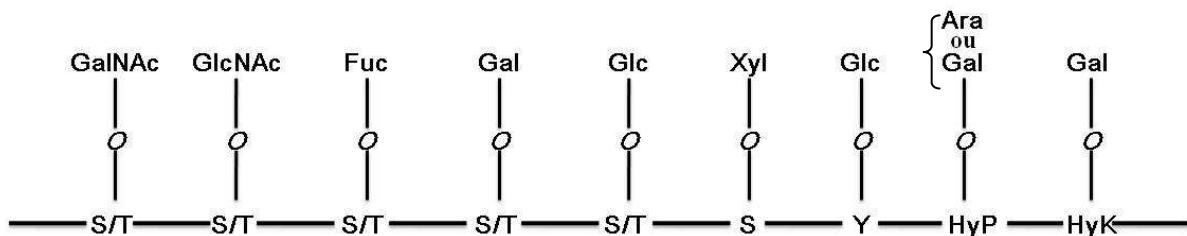


Figure 1 : Les différents monosaccharides engagés dans une liaison de type O-glycosidique sur des résidus de Sérine (S), de Thréonine (T), de Tyrosine (Y), d'hydroxyproline (HyP) ou d'hydroxylysine (HyK). *GalNAc* : N-acétylgalactosamine ; *GlcNAc* : N-acétylglucosamine ; *Fuc* : fucose ; *Gal* : galactose ; *Glc* : glucose ; *Xyl* : xylose ; *Ara* : arabinose

Il existe plusieurs types de O-glycannes dont la formation résulte toujours de l'addition successive et séquentielle d'autres monosaccharides sur l'ose de liaison (Brockhausen *et al.*, 1995). En fonction du type de glycanne, la chaîne peut être linéaire et courte dans le cas de la O-fucosylation et de la O-mannosylation (1 à 4 résidus), linéaire et très longue pour les protéoglycannes (>100 résidus) ; enfin, ramifiée et courte (de 1 à 15 résidus) sur les O-glycannes de type mucine.

1.1.1. La O-glycosylation de type mucine

Ce type de O-glycosylation fait référence aux protéines sur lesquelles il a été découvert. En effet, la structure primaire des mucines renferme un certain nombre de séquences répétées en tandem qui sont hyperglycosylées par ce type de O-glycannes (Figure 2), cette partie glycanne pouvant

représenter jusqu'à 80 % de la masse de la mucine (Dekker *et al.*, 2002 ; Hollingsworth *et al.*, 2004). Du fait de la densité et de l'encombrement stérique due à ces antennes glucidiques, la protéine présente une grande résistance aux protéases ainsi qu'une certaine rigidité qui la maintient sous une forme linéaire. Par ailleurs, ces glycanes augmentent la viscosité et la capacité des mucines à participer aux interactions cellule-cellule (Carraway et Hull, 1991; Strous et Dekker, 1992). Les mucines ne sont pas les seules glycoprotéines à posséder ce genre de structures glycaniques, celles-ci étant également abondamment exprimées par les protéines des épithéliums, de l'endothélium vasculaire et de la surface des érythrocytes où elles peuvent prendre la forme d'antigènes sanguins (ABO) ou tissulaires (Lewis).

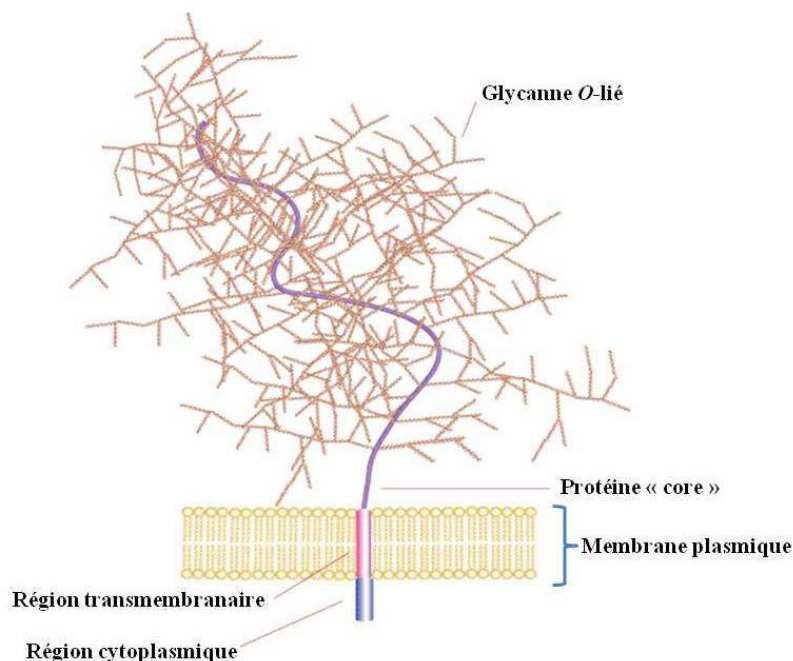


Figure 2 : Représentation schématique d'une mucine. La partie protéique de la mucine est représentée en violet/noir, les O-glycannes des mucines sont localisés au niveau de séquences répétées en tandem.

Les O-glycannes de type mucine présentent tous le même schéma structural. Ils sont constitués d'un noyau ou « core » qui permet l'ancrage du glycanne sur la partie protéique, d'un squelette polylactosaminique de taille variable sur lequel sont enfin greffés les oses périphériques. Leur biosynthèse s'effectue exclusivement dans l'appareil de Golgi et les monosaccharides les plus souvent rencontrés sont la N-acétylgalactosamine (GalNAc), le galactose (Gal), la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et les acides sialiques (NeuAc). Il existe 8 types de noyaux différents (Figure 3) mais quel que soit le noyau synthétisé, le premier ose transféré sur la sérine ou la thréonine est toujours une N-acétylgalactosamine. Celle-ci est greffée par une des enzymes de la famille des peptidyl-GalNAc transférases (ppGaNTases).

Cette famille d'enzymes comprend 13 membres caractérisés fonctionnellement chez les mammifères (Ten Hagen *et al.*, 2003). Ceux-ci présentent des profils d'expression spatiotemporels différents les uns des autres, bien qu'il arrive que certaines enzymes soient co-exprimées dans un même type cellulaire notamment au cours de l'embryogénèse. En effet, certains types de cellules requièrent l'utilisation de plusieurs de ces ppGaNNTases pour assurer une glycosylation convenable de leurs mucines (Ten Hagen *et al.*, 2003).

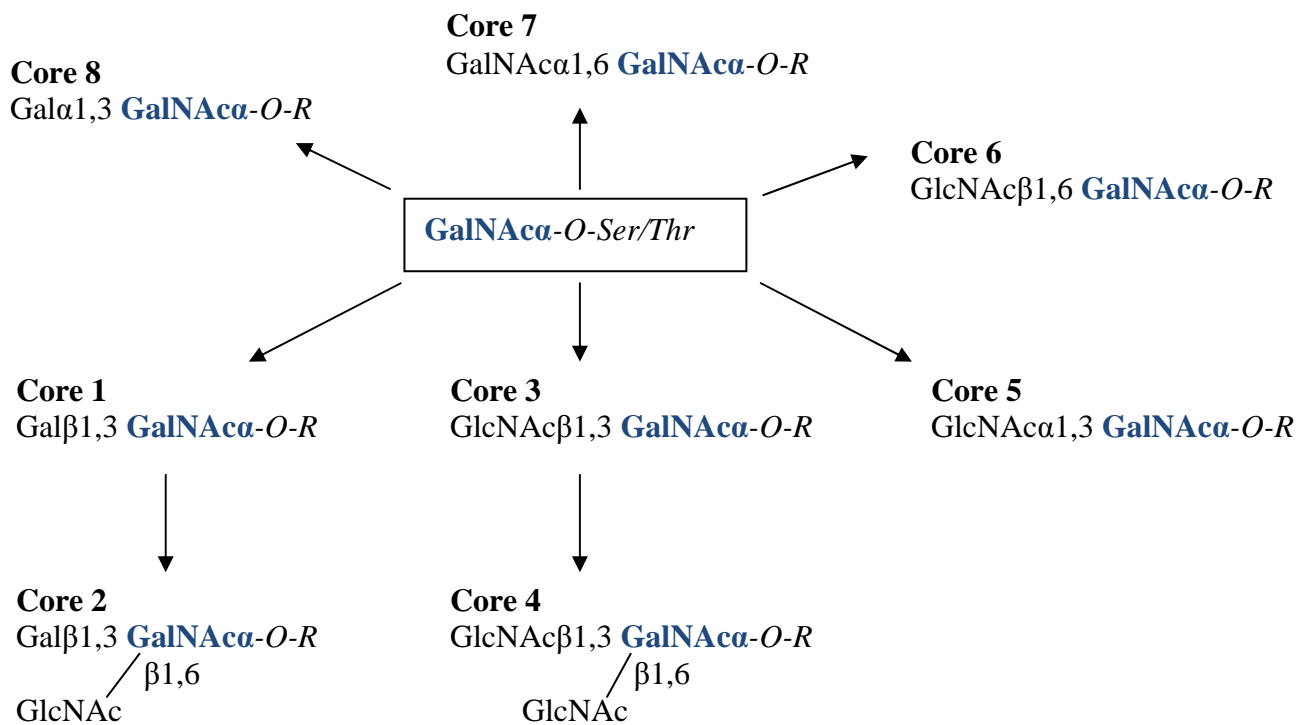


Figure 3 : Les différents noyaux ou « core » des O-glycannes de type mucine. *R* représente la sérine ou la thréonine sur laquelle est fixée le glycanne. La GalNAc initiale est indiquée en bleu.

L'étape suivante consiste à la formation du noyau di ou tri-saccharidique du glycanne à partir de la GalNAc. L'élongation s'effectue de manière séquentielle et la nature du noyau dépend du type de monosaccharide transféré (Figure 3). Les noyaux de type 1, 2, 3 et 4 sont portés par un très grand nombre de glycoprotéines (Hounsell *et al.*, 1980, 1982 et 1996) contrairement aux autres noyaux qui présentent une spécificité tissulaire plus marquée (Brockhausen, 1999). Au sein d'une population cellulaire, c'est le profil d'expression des glycosyltransférases et leur niveau d'expression relatif qui détermine les proportions de chacun des types de noyaux. A titre d'exemple, après la formation des noyaux 1 et 3, la GalNAc initiale pourra être sialylée sur son carbone 6 ce qui aura pour conséquence d'inhiber la formation des noyaux 2 et 4.

Il arrive parfois qu'il n'y ait pas d'élongation à partir de la GalNAc initiale. Cette GalNAc greffée sur la partie peptidique constitue alors l'antigène Tn (Thomsen nouveau). Enfin, une sialylation en $\alpha 2,6$ de la GalNAc initiale va former l'antigène Sialyl-Tn (Ikehara *et al.*, 1999), cette sialylation bloquant ainsi l'ajout de tout autre monosaccharide sur le *O*-glycane. Ces deux antigènes, exprimés dans la plupart des tumeurs du sein, sont associés à l'agressivité tumorale et notamment à la formation de métastases (Wang *et al.*, 1997 ; Julien *et al.*, 2005).

C'est seulement sur les noyaux 2 et 4 que s'ajoute le squelette polylactosaminique bien que dans de rares cas il puisse être ajouté par élongation du noyau 1. Il consiste en une chaîne de taille variable dont le maillon de base est le disaccharide Gal-GlcNAc. La chaîne sera dite de type « néolacto » ou de type I lorsque le Gal est lié à la GlcNAc par une liaison $\beta 1,3$. Elle sera dite de type II ou de la série « lacto » lorsque le Gal est lié par une liaison $\beta 1,4$ à la GlcNAc, cette chaîne étant également connue sous le nom d'antigène i (Figure 4).

Chaînes de type I ou de la série « néolacto »



Chaînes de type II ou de la série « lacto »



Antigène i

Structure branchée

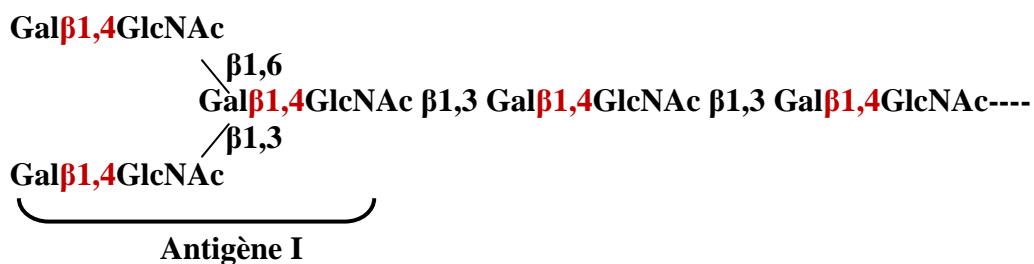


Figure 4 : Les chaînes polylactosaminiques constituant le squelette des *O*-glycannes

Par ailleurs, ce squelette polylactosaminique peut avoir à son extrémité des structures branchées. A titre d'exemple, une GlcNAc appartenant à un maillon de type II peut venir se fixer par une liaison $\beta 1,6$ sur le Gal de la chaîne squelettique, ce type de branchement étant connu sous le nom

d'antigène I (Figure 4). A la variabilité de taille de la chaîne et à son degré de branchement s'ajoute la nature des structures périphériques qui augmente la diversité des *O*-glycannes.

Les étapes finales de la biosynthèse des *O*-glycannes dépendent majoritairement de la sialylation et de la fucosylation du dernier maillon disaccharidique du squelette, et plus rarement de l'addition de galactose ou de N-acétylgalactosamine. Ces modifications de la périphérie des glycannes ont lieu dans un ordre bien précis, la structure qui résulte de l'action d'un type de glycosyltransférase ne pouvant pas être forcément utilisée comme substrat par n'importe quelle autre enzyme. Ainsi, l'ajout d'un Gal ou d'une GalNAc doit toujours avoir lieu avant l'ajout d'un acide sialique, lui-même devant être greffé avant un fucose. Ces structures périphériques ont des propriétés antigéniques qui pour beaucoup sont en rapport avec les groupes sanguins et tissulaires A, B, O et Lewis (Figure 5).

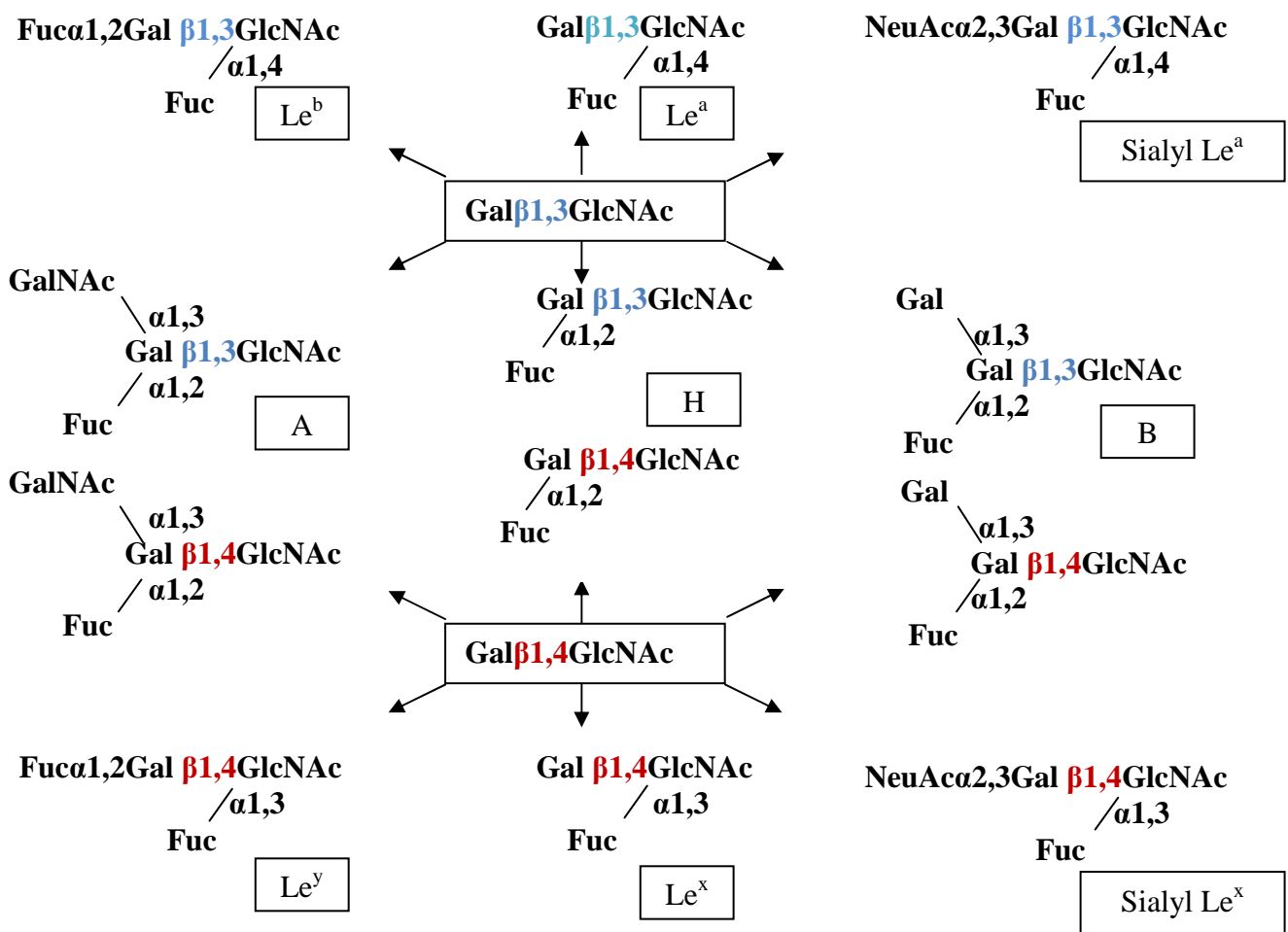


Figure 5 : Exemples de structures périphériques retrouvées sur les *O*-glycannes et impliqués dans le déterminisme des groupes sanguins. La liaison β1,3 formant les oligosaccharides de type I est représentée en bleu, la liaison β1,4 des oligosaccharides de type II est représentée en rouge.

1.1.2. Les O-glycannes de type GAG

Les glycosaminoglycannes (GAG) peuvent représenter jusqu'à 95% de la masse des protéoglycannes. Ces GAGs sont de longues chaînes glucidiques non ramifiées dont les maillons sont une unité disaccharidique qui est en général composée de l'association d'une osamine (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et d'un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique). La nature des deux monosaccharides et de la liaison qu'ils forment ont permis de classer les glycosaminoglycannes en quatre familles : les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates, les héparanes sulfates et les kératanes sulfates (Tableau I).

Tous les maillons des chaînes de dermatanes et d'héparanes sulfates ne sont pas identiques, certains pouvant contenir de l'acide glucuronique à la place de l'acide iduronique. L'acide iduronique est le résultat de l'épimérisation du carbone 5 de l'acide glucuronique et cette réaction n'a lieu que sur le GAG déjà synthétisé. Ainsi l'hétérogénéité observée entre les différents maillons de ces chaînes vient du fait que la 5-épimérase n'agit pas systématiquement sur toutes les unités disaccharidiques.

Tableau I : Structure et degré de sulfatation des différents types de glycosaminoglycannes (GAG). *GlcUA* : acide glucuronique ; *IdUA* : acide iduronique ; *GlcNH₂* : glucosamine ; *Gal* : galactose ; *GalNAc* : N-acétylgalactosamine ; *GlcNAc* : N-acétylglucosamine

GAG	Unité disaccharidique	Rapport Nombre SO ₄ ²⁻ /Nombre maillons
Chondroïtines sulfates	(GlcUAβ1,3GalNAc) _n β1,4	0,2-2,3
Dermatanes sulfates	(IdUAα1,3GalNAc) _n β1,4	1-2
Héparanes sulfates	(IdUAβ1,4GlcNH ₂) _n α1,4	0,2-2
Kératanes sulfates	(Galβ1,4GlcNAc) _n β1,3	0,9-1,8

Les GAGs sont des molécules ayant une forte charge négative due à la présence de groupement sulfates tout au long de la chaîne. L'addition de ces groupements a lieu au niveau des carbones 4 de la GalNAc, 2 des acides uroniques, 6 des osamines et 3 des N-sulfoGlcNAc. La sulfatation de ces chaînes n'est pas homogène et on peut observer des zones fortement sulfatées alors que d'autres le seront à peine.

A l'exception des chaînes de kératanes sulfates, directement greffées sur des *N*-glycannes ou des *O*-glycannes de type mucine, la liaison protéine-GAG s'effectue par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide dit de liaison, GlcUA β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Xyl (Fondeur-Gelinotte *et al.*, 2006), lié en β 1 sur le groupement hydroxyle d'une sérine (Figure 6). La biosynthèse du protéoglycane s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi.

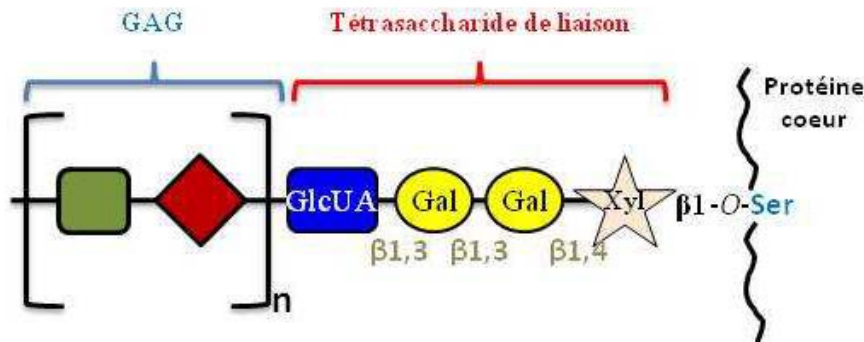


Figure 6 : Représentation schématique d'un protéoglycane de type chondroïtine, dermatane et héparane sulfate. Les liaisons entre les différents monosaccharides sont indiquées en gris. *GlcUA* : acide glucuronique ; *Gal* : galactose ; *Xyl* : xylose. *n* représente la répétition des unités disaccharidiques (voir Tableau I)

La taille de la protéine cœur qui porte le glycanne, allant de 20 à 500 kDa, la variabilité de la taille de la chaîne du GAG, son degré de sulfatation et d'épimérisation font des protéoglycannes des molécules présentant une infinité de combinaisons structurales.

Les protéoglycannes sont retrouvés dans certains compartiments cellulaires mais seront surtout des constituants de la surface cellulaire et de la matrice extra cellulaire (MEC) où ils forment un gel hydraté dont la taille des pores et la densité des charges varient en fonction des GAG présents. Leur rôle est alors d'assurer une résistance aux chocs mécaniques (Schonherr *et al.*, 1995). Leur implication a également été démontrée au cours de la morphogénèse. En effet, de part leur viscosité, les protéoglycannes facilitent les migrations cellulaires (Sanes, 2003 ; Spicer et Tien, 2004). Par ailleurs, ces structures glycaniques, très denses, sont de véritables pièges pour certaines molécules notamment lors de la réponse immunitaire. Les cellules infectées produisent des cytokines pro-inflammatoires qui vont être piégées par le GAG ce qui aura pour conséquence la formation d'une sorte de piste qui va faciliter le trajet du leucocyte vers le site infectieux (Middleton *et al.*, 2002). Cette propriété peut également être un inconvénient dans une pathologie comme le cancer. En effet, l'accumulation dans les GAGs de protéines sécrétées par les cellules cancéreuses favorise la progression tumorale (Yip *et al.*, 2006). De plus, le profil d'expression des protéoglycannes de la surface cellulaire est modifié durant la tumorigénèse. Ces modifications perturbent les interactions

cellule-cellule et favorisent la libération de cellules métastatiques (Yip *et al.*, 2006). Pour toutes ces raisons, les protéoglycannes deviennent de véritables cibles thérapeutiques contre le cancer.

En plus de celles présentées dans le paragraphe précédent, les propriétés des protéoglycannes sont très nombreuses et peuvent être citées à titre d'exemple le rôle anti-oxydant des chondroïtines sulfates vis-à-vis des radicaux libres (Campo *et al.*, 2006) ou les propriétés anticoagulantes de l'héparine, un dérivé de l'héparane sulfate (Petitou *et al.*, 1988). Enfin, ils sont des ligands de certains pathogènes (Reeder *et al.*, 1999 ; Portugal *et al.* 2008).

1.1.3. La O-mannosylation

Ce type de O-glycosylation a longtemps été considéré comme une spécificité de la levure. En effet, de très nombreuses protéines de la paroi cellulaire portent ce genre de modification (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). La O-mannosylation est même essentielle pour la viabilité de la levure, son absence affectant profondément la structure et la rigidité de la paroi. De même pour certains champignons pathogènes comme *Candida albicans* dont le métabolisme cellulaire et le pouvoir virulent sont perturbés lorsqu'il y a un défaut de O-mannosylation (Timpel *et al.*, 1998).

Les O-mannosylglycannes sont assez atypiques chez les mammifères, cette glycosylation a été initialement trouvée sur les chondroïtines sulfates (Finne *et al.*, 1979) et ne sera par la suite observée que sur un nombre limité de glycoprotéines du cerveau, des nerfs et des muscles squelettiques (Endo, 2004). La protéine O-mannosylée la mieux décrite est l' α -dystroglycane qui se fixe à la laminine par son O-mannosylglycane et participe ainsi au maintien de la structure cellulaire et aux interactions matrice-cellule (Chiba *et al.*, 1997 ; Sasaki *et al.*, 1998).

La biosynthèse du O-mannosylglycane débute dans le réticulum endoplasmique par le transfert d'un mannose sur le groupement hydroxyle d'une chaîne latérale de sérine ou de thréonine (Figure 7). Ce transfert peut être réalisé par deux enzymes, POMT1 (Jurado *et al.*, 1999) et POMT2 (Willer *et al.*, 2002) qui utilisent le Dolichol phosphate mannose comme substrat donneur. Il ne semble pas qu'il y ait de séquence consensus de O-mannosylation mais une proline à proximité d'une sérine ou thréonine la favorise (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). La suite de la biosynthèse est réalisée au niveau de l'appareil de Golgi et consiste au transfert d'une N-acétylglucosamine sur le

mannose par une liaison $\alpha 1,2$ (Figure 7). L'enzyme responsable de ce transfert est POMGnT1 dont l'activité s'avère spécifique de ce type de glycosylation (Taniguchi *et al.*, 2003). Les autres étapes de l'élongation du *O*-mannosylglycane consistent au transfert d'un galactose et d'un acide sialique (Figure 7) mais les enzymes impliquées n'ont pas été identifiées.

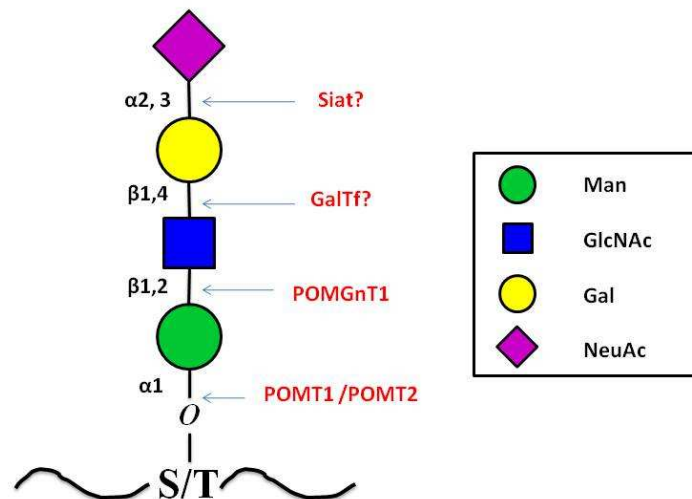


Figure 7: Représentation schématique d'un *O*-mannosylglycane. Les enzymes responsables de la formation du glycane sont indiquées en rouge. Seules les enzymes POMT1, POMT2 et POMGnT1 ont pu être identifiées.

La *O*-mannosylation est une glycosylation qui joue un rôle très important dans le développement musculaire et cérébral. Il existe en effet chez l'homme des pathologies de développement associées à des défauts de la biosynthèse des *O*-mannosylglycannes. Par exemple, la MEB (Muscle Eye Brain disease) est une maladie pour laquelle les patients présentent une dystrophie musculaire et des malformations cérébrales et oculaires (Taniguchi *et al.*, 2003). Cette maladie est imputable à l'absence de POMGnT1 dont le gène présente des mutations non sens dans sa région codante. La WWS (Walker Warburg Syndrom) va présenter les mêmes symptômes mais de façon plus sévère que la MEB du fait de l'absence de POMT1 fonctionnelle.

1.1.4. La *O*-fucosylation

La mise en évidence de ce type de *O*-glycosylation date de 1975 sur des protéines isolées dans les urines humaines (Hallgren *et al.*, 1975). Elle consiste au transfert d'un fucose sur une sérine ou une

thréonine, le glycanne pouvant ensuite être allongé ou non. La *O*-fucosylation est très ciblée car les *O*-fucosylglycannes ne se retrouvent qu'au niveau de protéines ayant des motifs EGF (Epidermal Growth Factor) (Harris et Spellman, 1993) et TSR (Thrombospondin type I Repeat) (Hofsteenge *et al.*, 2001).

Contrairement aux autres types de *O*-glycosylation, des séquences consensus de *O*-fucosylation ont été identifiées. Les motifs EGF et TSR contiennent dans leurs séquences 6 résidus de cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures (Figure 8) qui stabilisent la structure tridimensionnelle des motifs. La séquence consensus de *O*-fucosylation sur les motifs EGF est $C^2X_{4-5}(S/T)C^3$ (Shao et Haltiwanger, 2003) où C^2 et C^3 représentent les deuxième et troisième cystéines du domaine alors que le site consensus de *O*-fucosylation des motifs TSR (Figure 8B) est $WX_5C^1X_{2-3}(S/T)C^2X_2G$ (Luo et Haltiwanger, 2005), C^1 et C^2 étant les première et deuxième cystéines du domaine.

A.



B.



Figure 8 : Représentation schématique des motifs EGF et TSR. En (A) le motif EGF du facteur de coagulation IX humain et en (B) la séquence du motif TSR2 de la thrombospondine I humaine. Les cystéines conservées des motifs sont représentées en bleu ainsi que les ponts disulfures qu'elles forment. Les sites de *O*-fucosylation sont indiqués en rouge.

La première étape de la biosynthèse consiste au greffage du résidu de fucose sur la protéine. Deux enzymes assurant cette fonction ont été identifiées : Pofut1 (Protéine *O*-fucosyltransférase 1) et Pofut2 (Protéine *O*-fucosyltransférase 2). Chacune de ces enzymes va jouer un rôle particulier. En effet, Pofut1 est responsable de la *O*-fucosylation des motifs EGF (Wang *et al.*, 1996) et Pofut2 sera responsable de la *O*-fucosylation des domaines TSR (Luo *et al.*, 2006^a ; Luo *et al.*, 2006^b). Dans les deux cas, cette étape a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, les enzymes Pofut1 (Luo et Haltiwanger, 2005) et Pofut2 (Luo *et al.*, 2006^b) ayant été localisées dans ce compartiment.

Dans le cas des motifs EGF, le *O*-fucosylglycane pourra rester à l'état de monosaccharide (Facteur VII humain de coagulation) mais aura également la possibilité d'être allongé (Facteur IX). L'élongation de la chaîne glycanique s'effectuera alors dans l'appareil de Golgi et débutera par le transfert sur le fucose d'une N-acétylglucosamine. Cette élongation pourra se poursuivre par l'addition d'un galactose puis d'un acide sialique (Figure 9A). Les *O*-fucosylglycannes des domaines TSR semblent structurellement plus simples. Ils sont généralement présents à l'état de monosaccharide, mais il arrive qu'ils soient sous forme de structure disaccharidique sur des protéines telle que la thrombospondine où le glucose est lié au fucose par une liaison β 1,3 (Hofsteenge, 2001 ; Gonzalez de Peredo, 2002) (Figure 9B).

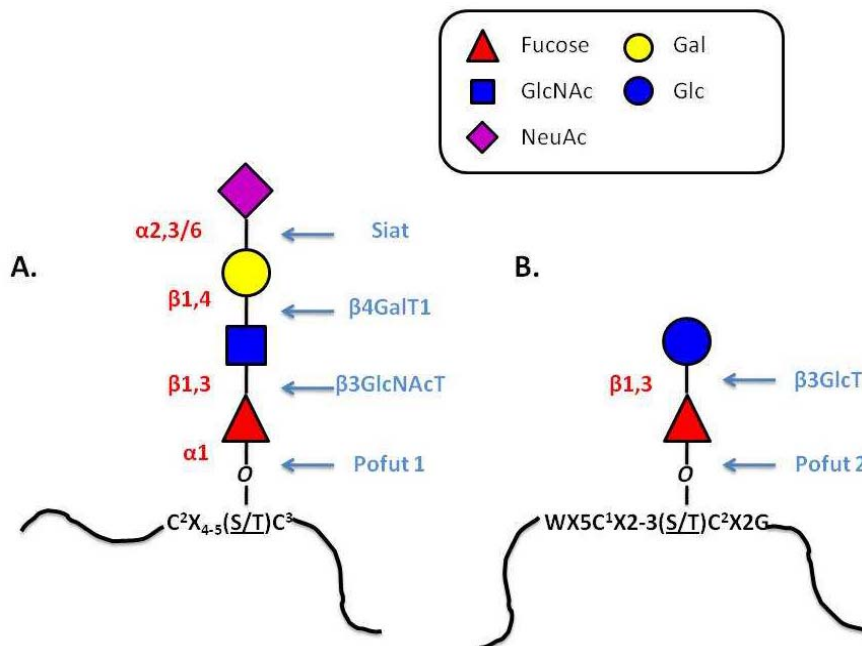


Figure 9 : Représentation de *O*-fucosylglycannes. En (A), un fucosylglycane fixé à un motif EGF, en (B) un exemple de fucosylglycane dans un domaine TSR. Les enzymes impliquées dans le transfert de chaque ose sont indiquées en bleu et la liaison formée entre les différents monosaccharides est indiquée en rouge.

Ces *O*-fucosylglycannes interviennent dans plusieurs processus physiologiques. A titre d'exemple, on pourra citer le fait que les *O*-fucosylglycannes du Facteur VII stabilisent les nombreux récepteurs à Ca^{2+} présents dans les domaines EGF. Cette stabilisation permet ainsi d'augmenter l'affinité ligand-récepteur (Kao *et al.*, 1999). Par ailleurs, la *O*-fucosylation des domaines EGF de l'activateur du plasminogène (Rabbani *et al.*, 1992) et de Notch (Chen *et al.*, 2001) est à la base de l'induction des cascades de signalisation initiées par ces récepteurs. Enfin, l'étude de la *O*-fucosylation des motifs TSR étant récente, peu de choses sont connues. Cependant, leur importance a pu être démontrée dans l'interaction de la thrombospondine avec certains de ces partenaires dont CD36 et qui lui confère des propriétés anti-angiogénique (Adams et Tucker, 2000).

1.1.5. La O-glycosylation

Elle consiste au transfert d'un résidu de glucose sur des sérines ou thréonines présentes dans les motifs EGF ou EGF-like de nombreuses protéines de surface (Harris et Spellman, 1993). Elle a été mise en évidence sur les facteurs de coagulation VII et IX bovins (Hase *et al.*, 1988) puis sur d'autres protéines comme le récepteur Notch et ses ligands (Moloney, Shair *et al.*, 2000), la protéine ZP humaine impliquée dans la fécondation (Nishimura *et al.*, 1989) et bien d'autres.

Le O-glycosylglycane peut rester sous forme de monosaccharide mais des formes allongées de type Xyl α 1,3Glc β 1-S/T ou Xyl α 1,3Xyl α 1,3Glc β 1-S/T ont été décrites. L'analyse comparative des différentes protéines portant ce type de glycosylation a permis l'identification d'un site consensus de O-glycosylation. Le glucose est ainsi transféré sur des motifs C¹XS/TXPC² des domaines EGF. Cependant, à ce jour, aucune enzyme assurant le transfert de ce glucose n'a été mise en évidence dans le règne animal contrairement au règne végétal où plusieurs O-glycosyltransférases ont été identifiées (Veitch *et al.*, 2003). Par ailleurs, les fonctions biologiques associées aux O-glycosylglycannes restent à déterminer.

1.1.6. La O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation)

Cette modification post-traductionnelle consiste au simple transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine sur des sérines ou thréonines. Le greffage est réalisé par une enzyme très conservée chez les eucaryotes, la O-GlcNAc Transférase, qui a la particularité d'être à la fois localisée dans le cytosol et le noyau des cellules (Akimoto *et al.*, 1999). Il y a en effet jusqu'à 65% d'identité entre l'enzyme humaine et l'enzyme de *Caenorhabditis elegans* (Lubas *et al.*, 1997) et presque 100% avec l'enzyme murine (Nolte *et al.*, 2002). Cet état de conservation inter espèce laisse présager du rôle essentiel joué par la O-N-acétylglucosaminylation. Son importance est d'ailleurs confirmée par le fait que des cellules ES (Embryonic Stem) murines délétées pour ce gène entrent en apoptose (Shafi *et al.*, 2000).

Il existe une relation entre la *O*-N-acétylglucosaminylation et la phosphorylation qui s'effectuent alternativement sur les mêmes résidus de sérine et de thréonine (Comer et Hart, 2001). Une *O*-GlcNAcase, identifiée en 1994 par Dong *et al.*, clive la GlcNAc qui peut alors être remplacée sur la sérine par un groupement phosphate.

De nombreuses protéines porteuses de cette modification ont été mises en évidence dans le noyau et le cytosol des cellules (Torres et Hart, 1984). Parmi celles-ci sont retrouvées l'ARN polymérase II (Kelly *et al.*, 1993), des facteurs de transcription (Sp1, NF- κ B), des protéines du cytosquelette (Tau, vinculine), des proto-oncogènes (c-myc, c-jun) ou encore des suppresseurs de tumeur (p53) (Shafi *et al.*, 2000). Découverte il y a 25 ans (Torres et Hart, 1984), les fonctions biologiques associées à la *O*-N-acétylglucosaminylation commencent à peine à être identifiées et restent à ce jour encore mal connues. Certaines équipes émettent l'hypothèse qu'elle serait un signal d'adressage nucléaire (Guinez *et al.*, 2005) mais qu'elle aurait cependant de nombreuses autres fonctions. Elle est certainement indispensable à la bonne localisation de la protéine c-myc mais est également essentielle pour sa stabilité (Kamemura *et al.*, 2002). La *O*-GlcNAcylation modifie le pouvoir transactivateur de Sp-1 (Roos *et al.*, 1997) et elle favorise l'activation de la transcription induite par p53 et NF- κ B (Yang *et al.*, 2006). Enfin, de récentes études montrent son implication dans des pathologies comme le diabète et la maladie d'Alzheimer (Dias et Hart, 2007), ce qui ouvre de nombreuses perspectives de recherche.

1.1.7. Implications physiologiques de la *O*-glycosylation

La description des différents types de motifs *O*-glycosidiques faite dans les paragraphes précédents nous a permis de mettre en évidence l'extrême diversité structurale des *O*-glycosylprotéines. Bien que très différents les uns des autres, *O*-glycannes de type mucine, GAG, etc... partagent des propriétés communes tant au niveau macromoléculaire qu'au niveau de la cellule ou de l'organisme. De plus, la multiplication de ces structures est loin d'être accessoire puisque chaque *O*-glycanne a des fonctions physiologiques qui peuvent lui être propres.

Au niveau moléculaire, leur présence est nécessaire dans le maintien de la structure tertiaire des protéines qui les porte. Ce rôle est même primordial dans le cas des mucines dont les propriétés physicochimiques sont dépendantes des glycannes comme il le sera aussi pour beaucoup d'autres

protéines. A titre d'exemple, le récepteur de la neutrophine doit son orientation à la présence de son *O*-glycane (Chapman *et al.*, 1996). Parallèlement à ce rôle conformationnel, les *O*-glycannes ont une fonction protectrice vis-à-vis de la protéolyse. En effet, la densité des chaînes glycaniques au niveau des régions hyperglycosylées de la mucine MUC1 masque les sites de protéolyse et empêche sa dégradation (Hanisch *et al.*, 2003). Ce mécanisme a également été observé pour la protéine MT1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase) (Remacle *et al.*, 2006) et pour l'IGFBP-6 (Insulin-like growth factor binding protein-6) dont une hypoglycosylation favorise leur dégradation (Marinero *et al.*, 2000).

Les structures terminales des *O*-glycannes sont en général associées à des antigènes. Ainsi, ils sont impliqués dans de nombreuses interactions de types cellule-cellule, cellule-protéine ou encore cellule-pathogène. Au cours du développement, neuronal la présence de l'antigène Lewis^x est essentielle pour la migration et l'adhésion de ces cellules (Brito *et al.*, 2007). De même, la présence des antigènes Sialyl-Lewis^x et 6-sulfo Sialyl-Lewis^x est indispensable au recrutement des leucocytes au niveau du site inflammatoire (Lowe, 2003), ces deux derniers épitopes feront d'ailleurs l'objet d'un chapitre de ce manuscrit.

De nombreuses modifications du profil d'expression de certains de ces épitopes sont observées au cours du développement tumoral. Les antigènes tissulaires Lewis (Figure 6) sont ainsi surexprimés durant le cancer de l'estomac (Sakamoto *et al.*, 1989), du colon (Cooper *et al.*, 1991) et du poumon (Jordon *et al.*, 1989). Dans ces deux derniers cancers, une surexpression des antigènes Tn et SialylTn est également observée (Julien *et al.*, 2005). De manière générale, l'apparition de ces structures antigéniques affecte les interactions cellulaires et est généralement associée à un stade avancé de la tumorigénèse.

1.2. La *N*-glycosylation

Les *N*-glycoprotéines représentent la classe la plus nombreuse des glycoprotéines (Vijay, 1998). La *N*-glycosylation, très conservée au cours de l'évolution, est retrouvée dans toutes les cellules eucaryotes, et ce, que l'organisme soit mono (levures, parasites) ou pluricellulaires (animaux, végétaux ou insectes) (Spiro, 2002). La *N*-glycosylation se révèle nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. En effet, elle s'avère indispensable à la survie de la cellule (Kukuruzinska et Lennon-Hopkins, 1999) et des défauts dans sa biosynthèse entraînent chez l'homme des pathologies rares regroupées sous le terme de CDG (Congenital Disorder of Glycosylation). Ces maladies ont plus ou moins de conséquences et peuvent se traduire par des troubles neurologiques, intestinaux, etc... (Jaeken et Matthijs, 2007). Par ailleurs, tout comme les *O*-glycannes, les structures *N*-glycanniques présentent une très grande variété structurale qui va de paire avec une grande diversité de leur implication au cours de différents processus physiopathologiques. Il a ainsi été mis en évidence que les *N*-glycannes jouaient un rôle essentiel pour la clairance des glycoprotéines sériques (Ashwell and Morell, 1974^{a et b}) et qu'ils intervenaient entre autres au cours de la différenciation cellulaire (Kim *et al.*, 2007) et du développement tumoral (Kanoh *et al.*, 2008).

1.2.1. Biosynthèse des *N*-glycannes

Contrairement à la *O*-glycosylation pour laquelle il existe de nombreuses variétés (type mucine, GAGs, *O*-fucosylation, etc...), tous les *N*-glycannes partagent un unique et même noyau, appelé cœur pentasaccharidique (Figure 10B), qui est greffé sur l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une asparagine de la protéine. Ce noyau commun, assemblé dans le réticulum endoplasmique, est constitué de deux résidus de N-acétylglucosamine et de trois résidus de mannose (GlcNAc₂Man₃), le glycanne étant fixé sur la protéine par l'intermédiaire d'un des résidus de GlcNAc. Ainsi, la diversité structurale observée sur les *N*-glycannes provient de la variété des structures périphériques qui seront greffées sur le cœur pentasaccharidique dans l'appareil de Golgi.

1.2.1.1. Dans le réticulum endoplasmique

La première étape de la biosynthèse des *N*-glycannes a lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Ceci implique que les protéines qui vont subir cette glycosylation soient des protéines membranaires, résidentes des différents compartiments de la voie de sécrétion ou encore secrétées. Il y a donc nécessité pour ces différentes protéines à être transloquées dans le RER de manière co-translationnelle (Roth, 2002). La séquence signal de translocation, courte séquence peptidique localisée dans la partie N-terminale de la protéine en cours d'élongation (Rapoport *et al.*, 1999), est clivée par une peptidase une fois la protéine synthétisée.

La biosynthèse du noyau des *N*-glycannes ne s'effectue pas directement sur la protéine de manière séquentielle. Un glycanne précurseur de type $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est dans un premier temps transféré « en bloc » d'un transporteur lipidique activé, le dolichol, vers une asparagine contenue dans la séquence consensus N-X-S/T (où X représente n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline) de la protéine en cours d'élongation (Gavel et Heinje, 1990 ; Pan et Elbein, 1990).

La biosynthèse et le greffage du glycanne précurseur s'effectue en plusieurs étapes (Figure 10). La première (Figure 10A (1)) consiste en l'activation par phosphorylation du dolichol, qui est un lipide membranaire du réticulum. Un premier résidu de GlcNAc phosphate est alors transféré sur le dolichol phosphate. Ce monosaccharide est greffé par la GlcNAc phosphate transférase à partir de l'UDP-GlcNAc et aboutit à la formation du dolichol-P-P-GlcNAc. Celui-ci devient alors le substrat pour une seconde GlcNAc transférase afin de synthétiser le dolichol-P-P-GlcNAc₂ (Figure 10A (2)). S'en suit l'obtention du glycanne dolichol-P-P-GlcNAc₂Man₅ par l'addition séquentielle de 5 résidus de mannose. Ces mannoses sont transférés par, dans l'ordre, une β 1,4 mannosyltransférase, une α 1,3 puis une α 1,6 mannosyltransférase et enfin deux α 1,2 mannosyltransférases différentes qui utilisent toutes le GDP-Man comme substrat donneur (Figure 10A (3)).

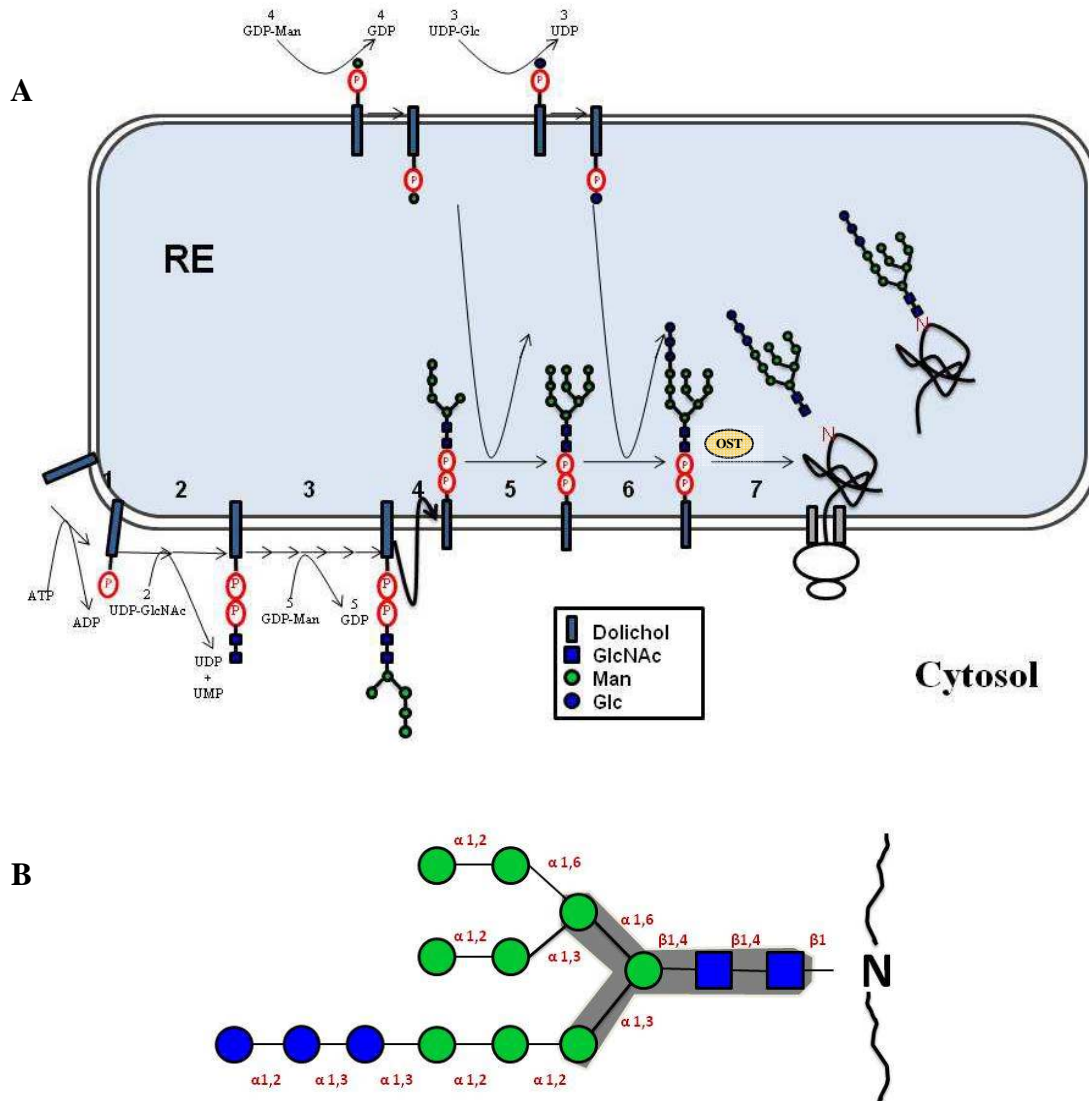


Figure 10 : Le glycanne précurseur du noyau des N-glycannes. En (A) est représenté la voie de biosynthèse de ce glycanne et son transfert sur la protéine dans le RER. Sa formation débute par la synthèse sur le dolichol du pentasaccharide $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ à la face cytosolique du RER (étapes 1 à 3). Après un mécanisme dit de « flip-flop » (étape 4), la synthèse du glycanne se poursuit à la face luminale du RER jusqu'à l'obtention du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (étapes 5 et 6), les 4 derniers résidus de mannose étant apportés par le Dol-P-Man et les 3 glucoses par le Dol-P-Glc. Le glycanne est alors transféré en bloc sur l'asparagine de la protéine en cours d'élongation à l'aide du complexe enzymatique oligosaccharyltransférase (OST) (étape 7). En (B) est représentée la structure de ce glycanne précurseur, avec en rouge, les liaisons existant entre chaque monosaccharide, le cœur pentasaccharidique commun à tous les N-glycannes est grisé.

Les premières étapes de la biosynthèse du glycanne précurseur ont lieu au niveau de la face cytosolique du RER. Après synthèse du dolichol-P-P-GlcNAc₂Man₅, il se produit une translocation du glycanne et de son socle lipidique par un mécanisme de basculement dit « flip-flop » (Figure 10A (4)) facilité par l'enzyme Rft1 (Helenius *et al.*, 2002). La synthèse du précurseur se poursuit alors à la face luminale du RER (Abeijon et Hirschberg, 1992).

Il y a ensuite transfert de 4 résidus de mannose (Figure 10A (5)) par 4 mannosyltransférases différentes. Elles utilisent comme substrat donneur le Dol-P-Man qui est synthétisé à la face cytosolique du réticulum par la Dol-P-Man synthase (Figure 10A (5)). Cette enzyme a également la propriété de transloquer le Dol-P-Man néo synthétisé à la face luminale du réticulum où il est utilisé par, respectivement, une α 1,3, une α 1,6 et deux α 1,2 mannosyltransférases (Figure 10A (5)). La synthèse du glycanne précurseur s'achève enfin avec le greffage de 3 résidus de glucose par deux α 1,2 et une α 1,3 glucosyltransférases ((Figure 10A (6)). Ces enzymes utilisent comme substrat donneur du Dol-P-Glc qui provient de l'addition d'un glucose sur le dolichol par la Dol-P-Glc synthase du côté cytosolique (Figure 10A (6)). Comme le Dol-P-Man, le Dol-P-Glc est transloqué par un mécanisme de « flip-flop » à la face luminale avant d'être utilisé. A la suite du greffage des 3 résidus de glucose, le glycanne précurseur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ est alors transféré « en bloc » sur la protéine en cours d'élongation (Figure 10A (7)) au niveau des séquences consensus (N-X-S/T). La réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé oligosaccharyltransférase (Silberstein et Gilmore, 1996). Le dolichol pyrophosphate (Dol-P-P) subit alors une seconde translocation avant d'être pris en charge par une dolichol pyrophosphatase qui élimine un phosphate et permet d'obtenir un nouveau Dol-P qui sera utilisé pour la synthèse d'un autre précurseur de *N*-glycannes.

Lié à la protéine, le glycanne précurseur (Figure 10B) va jouer un rôle important dans « le contrôle qualité » de la structure tertiaire de la protéine en interagissant avec la calnexine et la calréticuline. Si la protéine passe cette étape de vérification, les dernières étapes de biosynthèse du glycanne dans le réticulum peuvent continuer. Elles consistent au retrait séquentiel des 3 glucoses et du mannose central. La coupure du glucose lié en α 1,3 est catalysée par la Glucosidase I alors que les autres glucoses, liés en α 1,2 (Figure 11) sont clivés par la Glucosidase II (Kornfeld et Kornfeld, 1985). Pour terminer, il y a clivage du résidu central de mannose par la mannosidase I réticulaire pour aboutir au glycanne $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ (Figure 11), signal d'adressage de la protéine vers l'appareil de Golgi.

1.1.1.2. Dans l'appareil de Golgi

Le transport des *N*-glycoprotéines du réticulum vers le Golgi est un transport vésiculaire. Le glycanne $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ interagit avec la protéine membranaire ERGIC 53, cette interaction déclenchant la formation des vésicules et donc l'initiation du transport (Helenius et Aebi, 2001). Par

ailleurs, les *N*-glycannes de certaines glycoprotéines résidentes du réticulum endoplasmique doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi. Une fois l'élongation de leur glycanne terminée, ces protéines sont rapatriées au réticulum par un mécanisme de transfert rétrograde (Mancias et Goldberg, 2005).

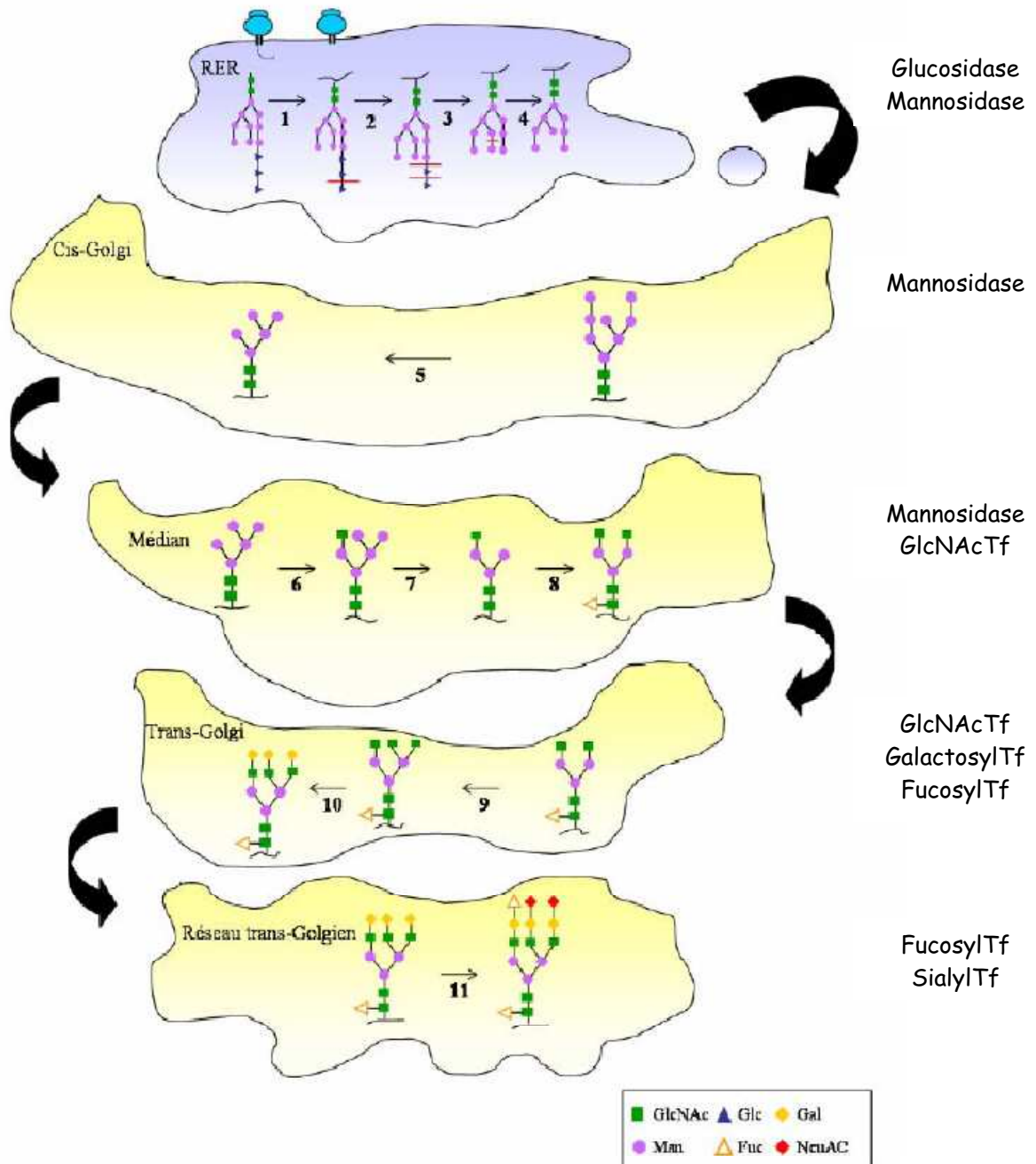


Figure 11 : La maturation des *N*-glycannes dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Dans le réticulum, les 3 glucoses (étapes 1, 2 et 3) puis le mannose central (étape 4) sont clivés du glycanne précurseur. Dans l'appareil de Golgi, les premières étapes consistent à retirer d'autres mannoses (étape 5) et d'ajouter d'autres monosaccharides (Gal, Fuc, NeuAc...) sur le glycanne (étapes 6 à 11). A droite de chaque compartiment sont indiquées les familles de glycosyltransférases intervenant dans la maturation golgienne des *N*-glycannes.

Le transfert réalisé, la maturation des glycanes des *N*-glycoprotéines s'effectue tout au long d'un cheminement dans les différents compartiments golgiens (Figure 11). Les premières étapes dans le cis-Golgi correspondent à l'élimination par la mannosidase I des structures mannosidiques (Figure 11 (5)) ; ces clivages permettent l'obtention de structures allant de 8 à 5 mannoses. Les glycanes sont ainsi élaborés grâce à l'action séquentielle de différentes glycosidases et glycosyltransférases réparties dans les compartiments médians et Trans-Golgi ; le greffage des oses périphériques que sont les acides sialiques et le fucose étant réalisé dans le réseau trans-golgien.

1.2.2. Structures et diversité des *N*-glycanes

La diversité des *N*-glycanes est quasiment illimitée. Elle s'explique par le nombre et l'hétérogénéité des antennes portées par le glycanne, par le type et la longueur des chaînes glycaniques et aussi par l'anométrie de liaison (α ou β) liant les différents oses entre eux. Il existe globalement 3 types de *N*-glycanes définis par les ramifications portées par le cœur pentasaccharidique GlcNAc₂Man₅ (Figure 12) : le type oligomannosidique, le type complexe et le type hybride (Geisow, 1991). Les proportions de chacun de ces glycanes varient en fonction de l'espèce, du type cellulaire mais aussi de l'état physiologique ou pathologique de la cellule (stress, inflammation, cancer...).

Les *N*-glycanes de type oligomannosidique possèdent de 2 à 6 résidus de mannose greffés sur le cœur pentasaccharidique. Ils sont retrouvés chez la plupart des organismes eucaryotes mais absents chez le poisson zèbre *Danio Rerio* (Guérardel *et al.*, 2006). En revanche, ils sont majoritaires chez la levure comme *Saccharomyces cerevisiae* chez qui des structures contenant plus de 100 résidus ont été retrouvées (Tanner et Lehle, 1987). Ces chaînes hypermannosylées sont très souvent immunogènes chez l'homme.

Les *N*-glycanes complexes possèdent un noyau sur lequel une *N*-acétylglucosamine est liée en β 1,2 sur chacun des mannoses terminaux. Les antennes des glycanes complexes sont élaborées à partir de ces résidus GlcNAc sur lesquels se greffent par une liaison β 1,3 ou β 1,4 un résidu de galactose. A la structure GlcNAc β 1,3/4Gal (*N*-acétyllactosamine) peuvent, dans certains cas, s'ajouter un fucose sur la GlcNAc en α 1,3 (Mammifères) ou α 1,4 (Mammifères et Plantes) et/ou un acide sialique lié en α 2,3 ou α 2,6 sur le galactose (Kornfeld et Kornfeld, 1985). De plus, en fonction des espèces le galactose peut porter comme chez l'homme et certains singes un fucose lié en α 1,2

(Kobata, 1984) ou chez les autres mammifères un autre galactose lié en $\alpha 1,3$ (Eckhardt et Golstein, 1983).

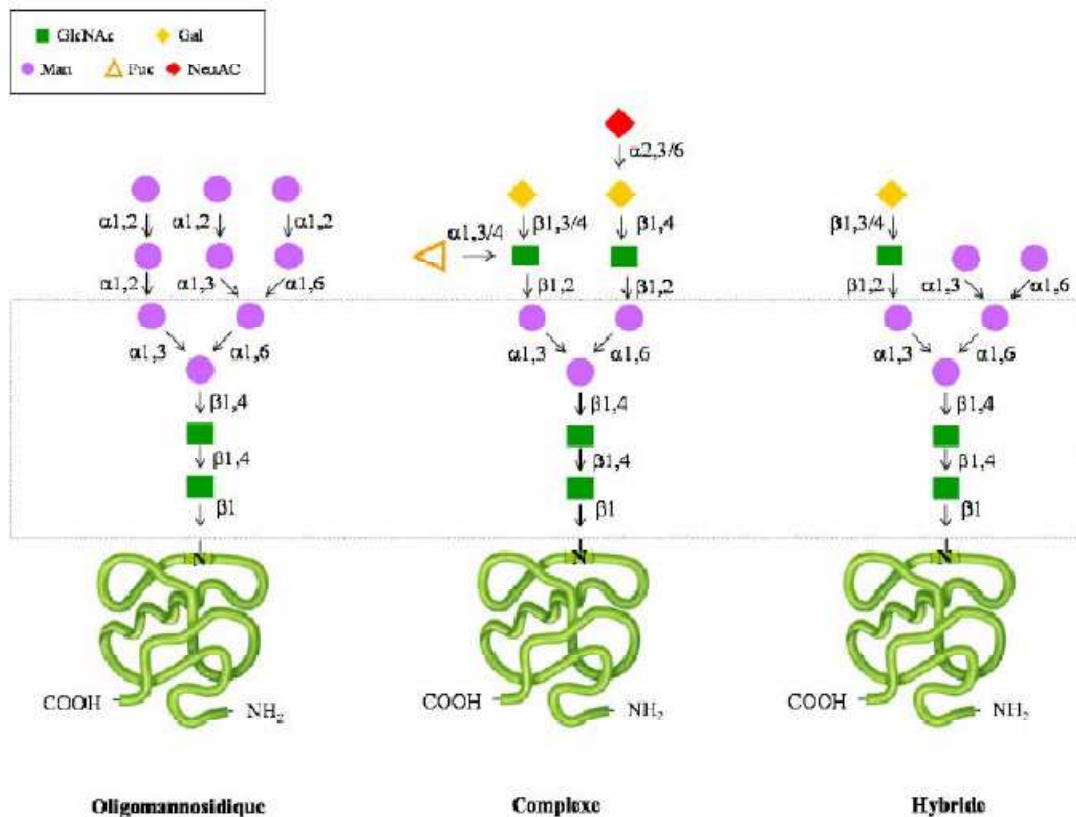


Figure 12 : Les trois différents types de *N*-glycannes présents chez les eucaryotes. Pour chacun d'eux, seul un exemple est représenté. La partie encadrée correspond au cœur pentasaccharidique commun à tous les *N*-glycannes (d'après Kornfeld et Kornfeld, 1985).

Les *N*-glycannes complexes ne se limitent pas seulement aux structures bi-antennées, des structures tri-, tétra- (Mammifères, Plantes, Insectes), voire penta-antennés (Oiseaux, Poissons) (Sakamoto *et al.*, 2000) sont également observées. De plus, la GlcNAc proximale du noyau porte souvent un résidu de fucose lié en $\alpha 1,6$ chez les mammifères, en $\alpha 1,3$ chez les plantes, en $\alpha 1,3$ et/ou en $\alpha 1,6$ chez les insectes (Oriol *et al.*, 1999^b). Il est également possible de trouver un résidu xylose greffé en $\beta 1,2$ (Plantes) (Olczak et Watorek, 2000) ou une GlcNAc en $\beta 1,4$ (Mammifères et Insectes) (Oguri *et al.*, 1997) sur le premier mannose du noyau. Quelques exemples illustrant ces complexifications sont répertoriés dans la figure 13.

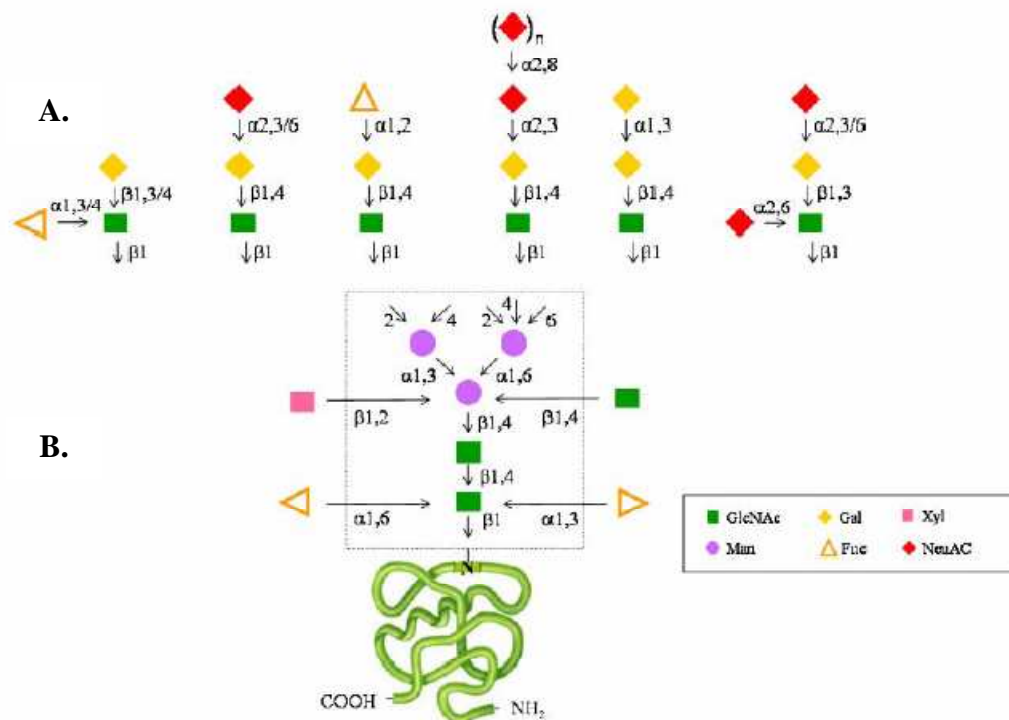


Figure 13 : Les différentes structures pouvant être présentes au niveau des *N*-glycannes de type complexe. La partie encadrée correspond au cœur pentasaccharidique commun entre les différents types de *N*-glycannes. En A, sont représentés quelques exemples de chaînes pouvant être retrouvées en périphérie des glycannes. En B, les modifications potentielles pouvant se produire au niveau de la structure cœur.

Les *N*-glycannes hybrides, constitués de deux antennes saccharidiques de nature différente, sont des structures intermédiaires entre les glycannes oligomannosidiques et complexes. L'antenne issue du résidu mannose lié en $\alpha 1,3$ au niveau du noyau est de type complexe alors que celle portée par le mannose lié en $\alpha 1,6$ est de type oligomannosidique (Chen *et al.*, 1998). Le noyau pentasaccharidique peut, quant à lui, subir les mêmes modifications que les *N*-glycannes complexes (Figure 13 B).

1.2.3. Fonctions biologiques des *N*-glycannes

Compte tenu de la proportion de glycoprotéines porteuses de *N*-glycannes, les fonctions biologiques pouvant leur être associées sont très nombreuses. Parmi les rôles principaux exercés par les *N*-glycannes, il est important de citer leur implication dans le repliement tridimensionnel des protéines, dans l'adressage intra-cellulaire de certaines protéines (Roth, 2002). De plus, à l'extérieur de la cellule, ils favorisent les interactions avec différents acteurs de l'environnement cellulaire tels que des hormones, des récepteurs, des enzymes ou encore d'autres cellules. Quoiqu'il en soit, nous

ne citerons pas dans les paragraphes suivants tous les exemples de fonctions associées aux *N*-glycannes et seuls quelques uns seront développés.

1.2.3.1. Contrôle qualité de la structure tridimensionnelle des *N*-glycoprotéines

Les protéines en cours de synthèse et qui s'engagent dans la voie de sécrétion doivent avoir une structure tertiaire correcte. L'obtention de cette structure est facilitée par des protéines chaperonnes telles que Hsp 70 (« Heat shock protein » 70 kDa), BiP (Binding Protein) également appelée Grp78 (Glucose regulated protein-78 kDa) présentes dans le RE. Lorsque la chaîne peptidique néo synthétisée entre dans le réticulum endoplasmique, elle est prise en charge par les protéines chaperonnes Hsp70 et BiP qui masquent les zones hydrophobes de la protéine et favorisent de fait la bonne mise en conformation de celle-ci. Notons également que des enzymes telles que la peptidyl-prolyl-isomérase, qui catalyse l'isomérisation *cis-trans* des prolines, la « Protein-Disulfide Isomerase » (PDI) et la protéine ERp57 qui contrôlent la formation des ponts disulfures (Bose *et al.*, 1994 ; Molinari *et al.*, 1999) sont également impliquées dans la mise en conformation des protéines dans le réticulum endoplasmique. Cependant et malgré la facilitation de la mise en conformation, il arrive que certaines protéines ne soient pas correctement repliées. La cellule, ne pouvant pas se permettre d'engager des protéines mal conformées dans la voie de sécrétion, se doit de pouvoir effectuer un contrôle de la qualité des protéines nouvellement synthétisées. Les protéines ne passant pas ce test sont alors conduites dans une voie de dégradation appelée ERAD (« Endoplasmic Reticulum Associated Degradation Pathway ») (Hampton, 2002 ; Kostova et Wolf, 2003).

Les *N*-glycannes sont particulièrement impliqués dans le contrôle qualité du repliement des protéines nouvellement synthétisées dans le RE par l'utilisation de l'UDP-Glc : Glycoprotéine Transférase (GT) et par des interactions avec deux lectines réticulaires (Trombetta *et al.*, 2000), la calnexine (CNX ; membranaire) et la calréticuline (CRT ; soluble) (Figure 14). L'interaction de la protéine avec la CNX/CRT s'effectue grâce au glycanne GlcNAc₂Man₉Glc₁ issu de la modification par les glucosidases I et II réticulaires du glycanne précurseur GlcNAc₂Man₉Glc₃ préalablement transféré sur la protéine (Kornfeld et Kornfeld, 1985). Cette interaction favorise également la mise en conformation de la protéine et sera maintenue tant que la Glucosidase II réticulaire n'aura pas clivé le dernier glucose restant. Une fois ce glucose éliminé, plusieurs situations sont envisageables.

La GT va évaluer dans un premier temps l'état de la conformation de la protéine et si celui-ci n'est pas correct, elle reglucosyle le *N*-glycane afin de permettre à la protéine d'effectuer un nouveau passage dans le cycle CNX/CRT (Figure 14) jusqu'à l'obtention de la structure native.

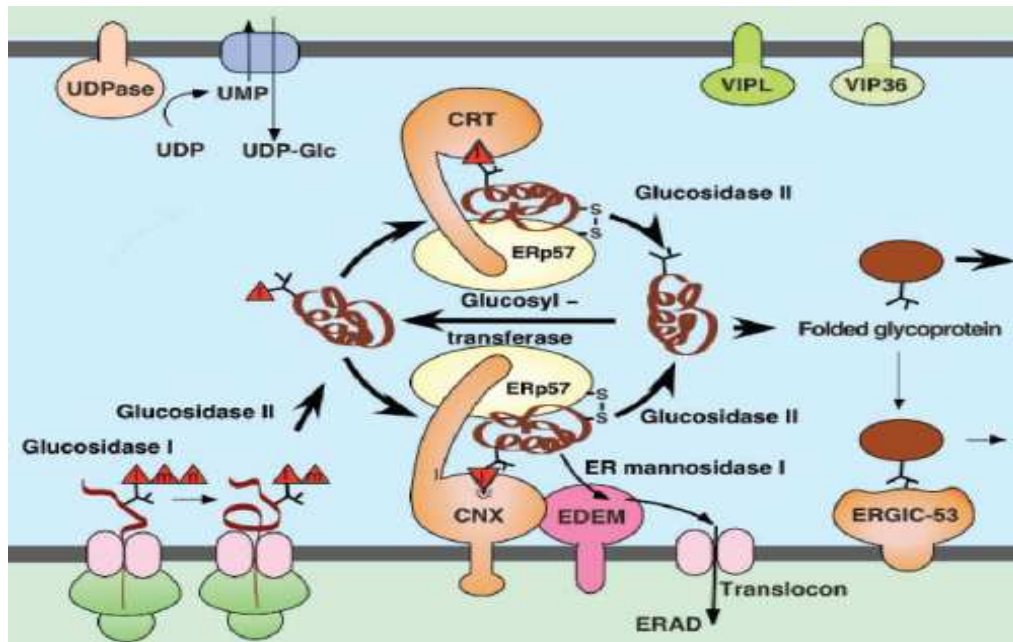


Figure 14 : Mise en conformation des protéines *N*-glycosylées au cours du cycle de la Calnexine (CNX) et de la Calréticuline (CRT) (d'après Helenius et Aebi, 2004). A son entrée dans le RER, la protéine naissante est prise en charge par des protéines chaperonnes puis par la CNX ou la CRT (l'une et l'autre étant associées à Erp57, chaperonne assurant la formation de ponts disulfures) quand deux des glucoses du glycane précurseur ont été enlevés sous l'action respective des Glucosidases I et II. Quand le résidu glucose restant est enlevé par la Glucosidase II, les complexes se dissocient. Si la protéine est mal conformationnée, elle est reglucosylée par la glucosyltransférase, puis le cycle recommence. Au bout d'un certain nombre de cycles, si la protéine demeure incorrectement repliée, et après l'action de l' α 2-mannosidase, sa reconnaissance conjointe par les complexes CNX-protéine chaperonne et EDEM induit son transport vers le cytoplasme où elle sera dégradée. A l'inverse, lorsque la protéine présente une conformation correcte, elle quitte le RER pour l'appareil de Golgi après avoir été reconnue par la lectine ERGIC 53 ou autre VIP36 et VIPL.

Dès que la protéine est correctement repliée et libérée du complexe CNX/Erp57 ou CNR/Erp57, l'action de la mannosidase I réticulaire conduit à des *N*-glycannes de type GlcNAc₂Man₈ (Figure 14), signal d'adressage vers l'appareil de Golgi. Cependant, si la protéine contient une séquence KDEL dans sa partie C-terminale (Monnat *et al.*, 2000), ou une séquence interne RXR (Scott *et al.*, 2003), elle restera dans le RE ou y reviendra par transport rétrograde après un bref passage dans le *cis*-Golgi (Pelham, 1996).

Le nombre de cycle glucosylation/déglucosylation n'est pas infini et certaines protéines n'obtiendront jamais la conformation optimale. C'est ainsi qu'une protéine déglucosylée mais

toujours fixée au complexe CNX/protéine chaperonne peut subir l'action de la mannosidase I. La structure GlcNAc₂Man₈ qui en résulte est reconnue par une autre lectine membranaire, EDEM, qui interagit avec la calnexine (Jakob *et al.*, 2001). La double interaction de la protéine avec les complexes CNX ou CRT et EDEM signifierait un mauvais repliement irréversible et entraînerait alors la protéine dans un processus de dégradation (Molinari *et al.*, 2003 ; Oda *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été montré récemment que EDEM jouerait aussi le rôle de protéine chaperonne et aiderait à la mise en conformation de la protéine (Olivari *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Maintien de la structure de la protéine

Du fait de leur composition et de leur taille, les *N*-glycannes sont capables de former de nombreuses interactions, de type ionique ou hydrogène, qui ont une incidence directe sur la conformation de la protéine qui les porte ; leur absence allant jusqu'à priver la protéine de toute fonction biologique. A titre d'exemple, la protéine Mid2p de la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae* est une protéine qui répond aux stress mécaniques subits par la paroi, et qui participe de fait au maintien de l'intégrité de celle-ci. Cette protéine porte un *N*-glycanne dont la présence et la composition sont essentielles à son activité. En effet, en absence du glycanne, il semble que Mid2p ne soit plus capable de percevoir les modifications de la paroi cellulaire, et, de plus, lorsque la composition du *N*-glycanne est modifiée la réponse au stress est retardée ce qui suggère très fortement que ce glycanne est directement impliqué dans le mécanisme de reconnaissance de Mid2p (Hutzler *et al.*, 2008).

D'autres exemples peuvent être cités. Les glycosyltransférases golgiennes possèdent pour la plupart au moins un *N*-glycanne. Il a été montré que l'enzyme ST3Gal V murine, qui permet la sialylation du lactosylcéramide pour former le GM3, est dépourvue d'activité enzymatique lorsque ses trois *N*-glycannes sont absents (Uemura *et al.*, 2006). Ce phénomène est également observé pour d'autres glycosyltransférases dont l' α 1,3-fucosyltransférase IV pour laquelle il a été prouvé chez le rat que l'abolition de la *N*-glycosylation entraîne une perte totale de l'activité (Baboval *et al.*, 2000).

La nature des *N*-glycannes des fragments Fc des IgG est particulièrement importante pour la fonction de ces anticorps. En effet, la présence de Gal terminaux favorisera la fixation du fragment

Fc sur le récepteur C1q ce qui augmente l'induction de la réponse CDC alors que la présence de GlcNAc en position terminale des antennes glycaniques la diminue. Dans le même ordre d'idée, la réponse ADCC est augmentée lorsque les *N*-glycannes ne contiennent pas de fucose lié en α 1,6 sur le chitobiose, l'absence de ce fucose facilitant l'interaction de l'IgG avec le récepteur Fc γ RIIIa (Raju, 2008).

1.2.3.3. L'adressage des protéines

Certains *N*-glycannes peuvent déterminer la localisation cellulaire des protéines qui les portent. L'exemple type est le cas des hydrolases acides qui participent à la dégradation des protéines dans les lysosomes. En effet, l'un des signaux d'adressage des protéines résidentes du lysosome est l'étiquette Man-6-Phosphate qui résulte de deux étapes enzymatiques successives. La première consiste à ajouter un résidu de N-acétylglucosamine-1-phosphate sur le carbone 6 de résidus de mannose, étape catalysée par l'UDP-N-acétylglucosamine lysosomal enzyme, N-acétylglucosamine phosphotransférase (Kornfeld *et al.*, 1999 ; Nair *et al.*, 2005). L'addition de GlcNAc-1-P ne s'effectue que sur les protéines à destination du lysosome qui présentent une conformation spatiale particulière, à savoir une large surface de contact pour l'enzyme et la présence de deux lysines très espacées à la surface de la protéine (Nishikawa *et al.*, 1999). Ce résidu de GlcNAc-1-P ajouté, la seconde étape consiste à éliminer le résidu de GlcNAc tout en laissant en place le phosphate. Cette réaction est catalysée par la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α N-acétylglucosaminidase localisée au niveau du réseau transgolgien (Kornfeld *et al.*, 1999). Les protéines ainsi étiquetées sont alors reconnues par deux récepteurs, l'un cation dépendant (récepteur mannose-6-phosphate ; Ghosh et Kornfeld, 2004), l'autre cation indépendant (Insulin-like Growth Factor 2 Receptor ; Ghosh et Kornfeld, 2004). L'interaction glycanne-récepteur induit alors la formation de vésicules au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi à destination des endosomes. Après fusion, du fait du pH acide retrouvé dans ce compartiment cellulaire, la protéine se dissocie de son récepteur. Les protéines sont ensuite acheminées vers le lysosome via les endosomes tardifs (Ghosh et Kornfeld., 2004).

De façon moins spécifique que pour les enzymes lysosomales, les *N*-glycannes permettent l'adressage du RE vers l'appareil de Golgi des glycoprotéines correctement repliées. En effet, à la sortie du cycle CNX/CRT, les *N*-glycannes sont de la forme GlcNAc₂Man₈ et l'interaction de ce glycanne avec une autre lectine membranaire du réticulum, ERGIC 53 (Figure 14), conduit à

l'adressage des protéines dans l'appareil de Golgi (Hauri *et al.*, 2002). En effet, la liaison glycoprotéine-ERGIC 53 induit la formation de vésicules COP I et II qui partiront une fois à destination des vésicules *cis*-golgiennes. Cependant, ce transport n'est pas uniquement réalisé via l'ERGIC 53 et d'autres lectines comme VIP36 et VIPL (Figure 14) interviennent dans l'adressage des glycoprotéines à destination golgienne (Helenius et Aebi, 2004).

1.2.3.4. Interactions cellule-matrice et cellule-cellule

L'adhésion de cellules entre elles ou avec la matrice extra-cellulaire est un phénomène essentiel pour l'homéostasie d'un organisme. Les mécanismes d'adhésion résultent de nombreux types d'interactions protéine-protéine, que celles-ci soit hétérotypiques dans le cas des liaisons entre intégrines et fibronectine ou encore homotypiques dans le cadre des interactions cadhérine-cadhérine.

Intégrines et cadhérines, acteurs essentiels de l'adhésion cellulaire, sont des glycoprotéines dont l'importance des structures *N*-glycanniques dans la modulation des interactions qu'elles forment est de plus en plus démontrée (Zhao *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, la plupart des différences d'adhérence cellulaire observées et liées à la glycosylation proviennent du nombre d'antennes portées par les *N*-glycannes ou de la présence d'un résidu de fucose lié en α 1,6 à la première GlcNAc du chitobiose. Le nombre d'antennes portées par le *N*-glycanne est régulé en partie par une compétition entre deux N-acétylglicosaminyltransférases, GnT-III qui transfère une GlcNAc en β 1,4 sur le mannose central ; et GnT-V, qui catalyse le transfert d'une GlcNAc en β 1,6 sur un mannose périphérique (Figure 15). Le fucose proximal, lié en α 1,6, est ajouté par la fucosyltransférase Fut 8 (Figure 15).

Les intégrines sont constituées de 2 sous-unités, α et β . Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β permettant la formation de 24 intégrines. Chacune de ces intégrines possède une fonction spécifique et non redondante dans l'organisme (Hynes, 2002). L'importance de la *N*-glycosylation dans la modulation de l'adhérence de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ a été mise en évidence lors de la comparaison des glycannes entre des cellules non métastatiques et métastatiques de mélanomes dont l'adhérence à la matrice est fortement diminuée. En effet, les intégrines de cellules métastatiques présentent des *N*-

glycannes contenant un plus grand nombre de structures branchées en $\beta 1,6$ que les *N*-glycannes de cellules non métastatiques. Ceci étant lié à une surexpression du gène *GnT-V* (Figure 15) dans les cellules métastatiques (Pochech *et al.*, 2003).

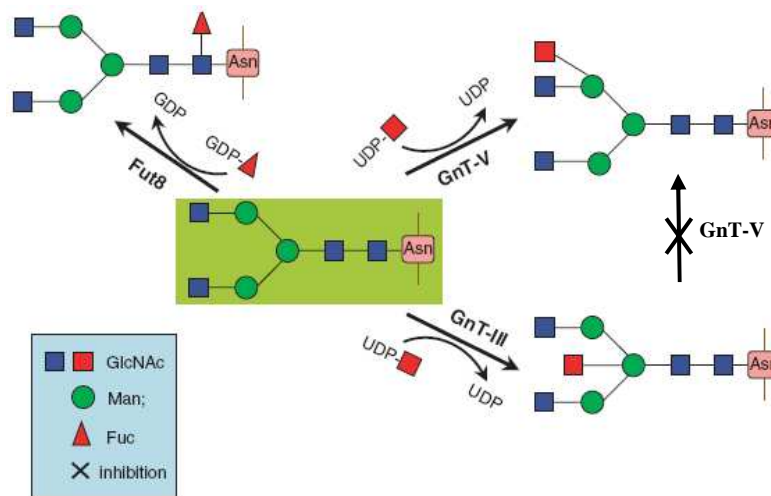


Figure 15 : Les réactions de glycosylation catalysées par GnT-III, GnT-V et FUT8 (d'après Zhao *et al.*, 2008). *GnT-III* et *V* utilisent toutes deux l'UDP-GlcNAc comme substrat donneur. *GnT-III* favorise la liaison en $\beta 1,4$ d'une GlcNAc sur le Man central alors que *GnT-V* va permettre la formation d'antennes en greffant un résidu de GlcNAc sur un Man déjà substitué par une GlcNAc en $\beta 1,2$. *FUT 8* va quant à elle permettre le greffage d'un résidu de Fuc à partir du nucléotide sucre GDP-Fuc sur la GlcNAc proximale du *N*-glycane.

En revanche, la délétion du gène *GnT-V* dans des fibroblastes embryonnaires de souris a comme conséquence une augmentation de structures glycaniques branchées en $\beta 1,4$ formées par la *GnT-III* sur l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Les effets de cette délétion se traduisent par une forte augmentation de l'adhérence des cellules au support (Guo *et al.*, 2005). De manière générale, il semble que l'augmentation de l'expression de *GnT-III* favorise l'adhésion cellulaire. De plus, la présence d'une GlcNAc liée en $\beta 1,4$ sur le mannose central (Figure 15) inhibe l'action de la *GnT-V* (Schachter, 1986).

La fucosylation de la première GlcNAc du chitobiose en $\alpha 1,6$ (Figure 15) semble également avoir de l'importance pour les propriétés adhérentes de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$. En effet, des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris *FUT8*^{-/-}, et donc dépourvues de ce fucose, présentent une migration des cellules le long de la matrice très retardée (Zhao *et al.*, 2008). Un dernier exemple illustrant l'importance des *N*-glycannes dans les interactions cellulaires est celui des E-cadhérines. Il a été montré qu'une surexpression de *GnT-III* augmentait l'adhésion homotypique des E-cadhérines entre elles (Yoshimura *et al.*, 1996).

1.2.3.5. Pathologies associées aux N-glycannes

La N-glycosylation, tout du moins dans la formation de son noyau/core est un phénomène très conservé chez les organismes eucaryotes. Cet état de conservation souligne l'importance vitale de cette modification post-traductionnelle pour l'organisme, l'absence totale de N-glycosylation étant létale (Marek *et al.*, 1999). Il existe cependant des anomalies de la glycosylation, appelées CDG (Congenital Disorder of the Glycosylation) dont les répercussions physiologiques sont plus ou moins importantes en fonction de la « normalité » du N-glycane (Figure 16) (Aebi et Hennet, 2001).

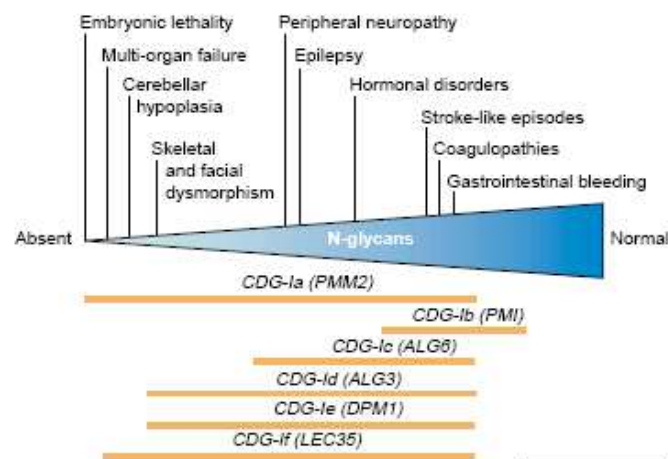


Figure 16 : Relation entre les manifestations cliniques et l'état d'élongation des N-glycannes chez des patients atteints de CDG (d'après Aebi et Hennet, 2001). Le triangle bleu représente le degré de glycosylation de N-glycosylation des glycoprotéines. Les phénotypes des patients sont indiqués au dessus du triangle ; le panel des symptômes retrouvés pour chacune des CDG est représenté par les barres oranges et les gènes mutés pour chacune des CDG sont précisés entre parenthèses.

Il existe deux types de CDG associés à la N-glycosylation. On parle de CDG de type I lorsque le défaut de glycosylation provient de mutations de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse ou le transfert du précurseur oligosaccharidique au niveau du RE, et de CDG de type II lorsque les mutations touchent des gènes dont les produits sont impliqués dans la maturation du glycane (Dennis *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, 12 CDG de type I (Ia à IL) et 6 CDG de type II (IIa à IIf) ont pu être identifiées. Cette famille de pathologies est en forte expansion (Jaeken et Matthijs, 2007) notamment avec la découverte de CDG affectant la O-glycosylation.

Ainsi, les CDG de type I vont provenir de mutations au niveau des deux gènes impliqués dans la formation du substrat donneur GDP-Man à partir du Fructose-6P (CDG Ia (Van Schaftingen et Jaeken, 1995) ; CDG Ib (Niehues *et al.*, 1998), mais aussi de mutations sur une grande partie des gènes impliqués dans la biosynthèse du *N*-glycane dans le réticulum endoplasmique. Parmi ces gènes, nous pouvons citer celui de la mannosyltransférase qui transfère le premier mannose sur le lipide activé Dol-P-P-GlcNAc₂ à la face externe du réticulum endoplasmique et dont l'absence d'activité provoque la CDG-Ik (Grubenmann *et al.*, 2004), ou encore le gène de la glucosyltransférase dont la fonction est le transfert du second glucose à la face interne du réticulum sur le Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₁. Une mutation inactivant ce gène induit l'apparition de la CDG-Ih (Chantret *et al.*, 2003).

A l'exception de la CDG IIb dont la mutation causale affecte le gène de la glucosidase I (De Praeter *et al.*, 2000), toutes les autres CDG de type II sont dues à des mutations sur des gènes intervenant plus ou moins directement dans la maturation golgienne du *N*-glycane. Il est intéressant de noter que les gènes mutés touchent à la fois des gènes de glycosyltransférases comme *GlcNAcT-II* pour la CDG IIa (Jaeken *et al.*, 1994) mais aussi des gènes de transporteurs de glycosyl-nucléotide. A titre d'exemple, les CDG IIc et IIe sont respectivement causées par des mutations sur les gènes de transporteurs d'acide sialique (Martinez-Duncker *et al.*, 2005) et de fucose (Lübke *et al.*, 2001 ; Lühn *et al.*, 2001). Par ailleurs, la CDG IIe est une pathologie dont les symptômes étaient déjà connus avant l'identification de la mutation causale. En effet, cette maladie était dénommée LAD II (Leukocyte Adhesion Deficiency) et ses effets se traduisent par une anomalie de l'adhérence des leucocytes lors de la diapédèse (Anderson et Springer, 1987). Compte tenu du nombre d'enzymes impliquées dans la maturation golgienne des *N*-glycannes, il est fort probable que cette liste soit très loin d'être exhaustive.

2. L'épitope Sialyl- α 2,6-lactosamine : biosynthèse et rôles physiologiques

Après avoir décrit dans la première partie de ce manuscrit la plupart des glycosylations pouvant être retrouvées sur les protéines, ce chapitre de la thèse a pour but de présenter l'élaboration et les fonctions des structures sialylées et plus particulièrement celles d'un des motifs des plus répandus sur les chaînes glycaniques, la Sialyl- α 2,6-lactosamine (Sia₆LacNAc). Cette structure est majoritairement retrouvée sur les antennes des *N*-glycannes mais sa présence est également détectée sur les chaînes des *O*-glycannes et des glycolipides (Dall'Olio, 2000). De plus, elle est aussi retrouvée sous forme d'oligosaccharide libre dans le lait. Elle se compose d'une lactosamine (Gal β 1,4GlcNAc) dont l'hydroxyle porté par le carbone 6 du galactose est substitué par un résidu d'acide sialique. Le Sialyl- α 2,6-lactosamine, comme toutes les structures sialylées périphériques, est en contact direct avec le milieu extérieur de la cellule et joue de ce fait de nombreuses fonctions physiologiques. Il peut être en l'occurrence un épitope reconnu par des lectines et participer aux interactions cellule-cellule ou encore à l'activation des lymphocytes B par le biais d'interactions protéine-protéine. Ce motif est également associé aux réponses immunitaire et inflammatoire. Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire la biosynthèse de cet épitope glucidique et plus particulièrement l'étape finale de celle-ci, la sialylation. Le transfert d'un résidu d'un acide sialique sur une chaîne glucidique est réalisé par une famille de glycosyltransférases, les sialyltransférases.

2.1. Les sialyltransférases

A l'heure actuelle, vingt gènes codant pour des sialyltransférases ont pu être mis en évidence dans les génomes humains et murins (Harduin-Lepers *et al.*, 2005). Ces enzymes sont capables de transférer un acide sialique en périphérie des chaînes glycaniques à partir de sa forme activée, le glycosyl-nucléotide CMP- β -Sia. Les sialyltransférases sont considérées comme des enzymes

« invertives » car au cours de la catalyse, dont le schéma réactionnel général est indiqué ci-dessous, l'acide sialique fixé en anomérie β au CMP est systématiquement transféré sur la structure acceptrice en anomérie α .



Outre cette spécificité vis-à-vis de leur substrat donneur, les sialyltransférases présentent une étroite spécificité de la liaison qu'elles forment sur les différents substrats accepteurs. En effet, les acides sialiques sont retrouvés liés à un résidu de Gal en $\alpha 2,3$, en $\alpha 2,6$ sur un Gal ou une GalNAc ou encore en $\alpha 2,8$ sur d'autres acides sialiques. Ces caractéristiques de liaison et de substrats accepteurs ont permis l'établissement d'une classification des sialyltransférases (Tsuji *et al.*, 1996). Ces enzymes sont donc réparties en 4 sous-familles, les ST3Gal, les ST6Gal, les ST6GalNAc et les ST8Sia (Tableau II). Ainsi, les ST6Gal catalysent le transfert d'un acide sialique sur l'hydroxyle en C₆ d'un résidu de galactose, ce dernier étant porté par une structure lactosaminique (Gal β 1,4GlcNAc). A l'exception des ST6Gal qui ne comptent que deux membres, 6 enzymes ont été décrites pour chacun des autres groupes de sialyltransférases chez les mammifères. Toutes ces enzymes constituent une famille de glycosyltransférases et sont répertoriées dans la famille 29 de la banque de données CAZy (<http://www.cazy.org/>).

Tableau II : Classification des sialyltransférases. Ces enzymes sont séparées en 4 groupes différents en fonction du type de liaison formé et de l'ose sur lequel elles transfèrent l'acide sialique. Gal : galactose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; Sia : acide sialique.

Groupe	Accepteur	Liaison	Enzymes
ST3Gal	Gal	$\alpha 2,3$	ST3Gal -I, -II, -III, -IV, -V et -VI
ST6Gal	Gal	$\alpha 2,6$	ST6Gal -I et -II
ST6GalNAc	GalNAc	$\alpha 2,6$	ST6GalNAc -I, -II, -III, -IV, -V et -VI
ST8Sia	Sia	$\alpha 2,8$	ST8Sia -I, -II, -III, -IV, -V et -VI

2.1.1. Structure moléculaire des sialyltransférases

Alors que le nombre de structures cristallographiques de sialyltransférases bactériennes comme celles de *Pasteurella multocida* (Kim *et al.*, 2008) et de *Photobacterium sp.* (Kakuta *et al.*, 2008 ; Okino *et al.*, 2007) augmente et facilite la compréhension de leur mécanisme catalytique, aucune structure tridimensionnelle de sialyltransférases de cellule eucaryote n'a encore pu être obtenue. Cependant, l'analyse des séquences primaires déduites de ces enzymes et de leur profil d'hydrophobicité a permis de déterminer leur organisation générale (Figure 17). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type II, résidentes de l'appareil de Golgi, constituées d'une courte région N-terminale cytoplasmique d'une vingtaine d'acides aminés, d'une unique région transmembranaire de 17 à 23 acides aminés et enfin d'une région tige de taille très variable (20 à 200 acides aminés) prolongée par un domaine C-terminal catalytique de 300 à 350 acides aminés, région tige et domaine catalytique étant localisés dans la lumière de l'appareil de Golgi.

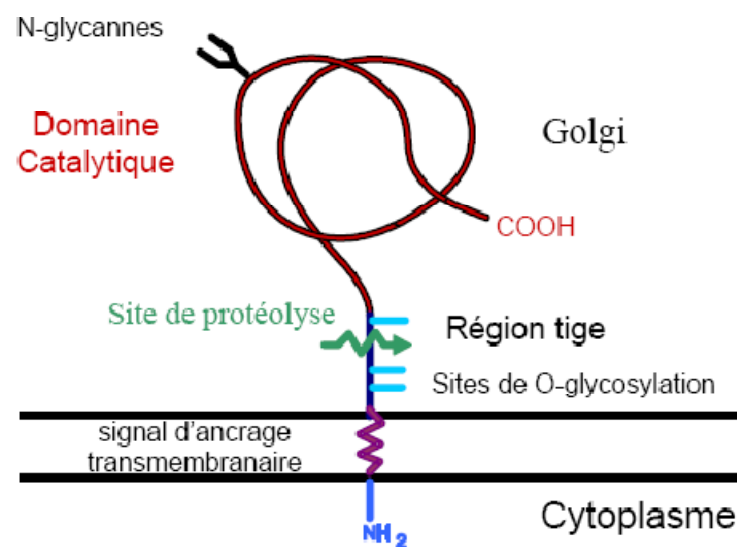


Figure 17 : Représentation schématique de l'organisation générale des sialyltransférases. Ces glycoprotéines transmembranaires de type II ont un domaine catalytique orienté dans la lumière golgienne. Elles peuvent être N- et O-glycosylées. Certaines sialyltransférases peuvent contenir des sites de protéolyse au niveau de la région tige.

Bien que membranaires, certaines sialyltransférases ont été retrouvées sous formes d'enzymes solubles et actives dans les liquides biologiques tels que le sérum ou encore le colostrum. Ces formes tronquées de sialyltransférases proviennent d'un clivage protéolytique au niveau de la région tige des formes membranaires (Weinstein *et al.*, 1987) mais les fonctions biologiques associées à ces formes solubles n'ont, à ce jour, pas encore pu être clairement établies. Il a cependant été démontré par la production de protéines recombinantes délétées des régions N-terminale,

transmembranaire et tige de ST6Gal I (Chen *et al.*, 2000) et ST3Gal I (Vallejo-Ruiz *et al.*, 2001) que la perte de ces régions n'altère pas l'activité enzymatique. Cette propriété des sialyltransférases a d'ailleurs fortement facilité l'étude de leurs caractéristiques enzymatiques.

Une analyse comparative plus approfondie des différentes séquences primaires de ces enzymes révèle que, malgré cette organisation structurale commune, les sialyltransférases ne partagent globalement que peu d'identités de séquences entre elles. A titre d'exemple, il n'y a que de 15 à 57% d'identité entre les enzymes humaines (Harduin-Lepers *et al.*, 2005). Cependant, il existe 4 régions hautement conservées localisées dans le domaine catalytique, les sialylmotifs L (Large) ou I, S (Small) ou II, motif III et VS (Very Small) ou IV (Drickamer, 1993 ; Livingston et Paulson, 1993 ; Jeanneau *et al.*, 2004 ; Geremia *et al.*, 1997) (Figure 18) qui constituent de véritables empreintes des sialyltransférases et qui ont grandement favorisé l'identification et le clonage de gènes de nombreuses sialyltransférases de cellules eucaryotes.

sialylmotifs	L				S				VS									
	motif I				motif II				motif III	motif IV								
hST6Gal I	181	WGR	CAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN	GAPTAN-FQQDVG	TKTT	<92>	PSSGMLGIIIMM	TLCDQVDIYEF	<10>	YYQQ	<12>	HPLLYE						
hST6Gal II	293	LRS	CAVVMASAGALNSSLGEEIDSHDAVLRFN	SAPTRG-YEKDVG	NKTT	<93>	PSSGFIGILIMMS	MCREVHVVEV	<10>	HYHE	<12>	HPLLYE						
hST6GalNAc I	362	CIT	CAVVGNGGILNNSHM	QGEIDSHDYVFR	LSGALIKG-YEQDVG	TRTS	<109>	PTTGALLLLTALQ	LCDQVSAYGF	<10>	HYDD	<11>	HDFKLE					
hST6GalNAc II	148	CIR	CAVVGNGGILNNGSRQ	GPNI DAHDYVFR	LNGAVIKG-FERDVG	TKTS	<107>	PSTGALMLLTALHT	CDQVSAYGF	<10>	HYFE	<11>	HDLSLE					
hST6GalNAc III	77	CDL	CAIVSNSSGQMVGGQKV	GNEDRSSCIWR	MNNAPTKG-YEEDVG	RMTM	<90>	LSTGWF	TFLAMDACYGIH	VYGM	<16>	HYFE	<19>	HRFITE				
hST6GalNAc IV	73	CRS	CAVVSSSQMLGSGL	GAEIDSAECVFR	MNQAPT	TVG-FEADVG	QRTT	<90>	LSTGWF	TMLALELCEEIV	VYGM	<16>	HYFE	<20>	HRFITE			
hST6GalNAc V	93	CRD	CALVTSSGHL	LHSRQGSQIDQTE	CVIR	MNDAPTRG-YGRDVG	NRTS	<90>	LSTGWF	TMTIALEL	CDRIN	VYGM	<16>	HYFE	<21>	HRFITE		
hST6GalNAcVI	71	CHQ	CVIVSSSHLLG	TKLGPETIERA	ECTIRMNDAP	TTG-YSADVG	NKTT	<89>	LSTGWF	TMVIAVEL	CDHV	VYGM	<17>	HYFE	<21>	HRFITE		
hST3Gal I	139	CRR	CAVVGNSGNLRESSY	GPEIDSHDFVLR	MNKA	P	TAG-FEADVG	TKTT	<80>	PSTGILSVIFSM	HCDEV	DLYGF	<9>	HYWE	<13>	HDADFE		
hST3Gal II	149	CRR	CAVVGNSGNLRGSGY	GQDVGHN	FIMR	MNQAPT	TVG-FEQDVG	SRTT	<80>	PSTGMLVLP	FALHVC	DEV	VNYGF	<9>	HYWE	<13>	HDADFE	
hST3Gal III	157	CRR	CIIVGNGGVLANKSL	GSRIDYD	IVRLNS	APVKG-FEKDVG	SKTT	<95>	PTLGS	VAVTMALHGC	DEVA	VAGF	<11>	HYFE	<12>	HNIQRE		
hST3Gal IV	116	CRR	CVVVGNGHRLRNSSL	GDAINKYD	VVIR	LNNAPVAG-YEGDVG	SKTT	<94>	PTGLLA	ITLALHLC	DLVH	IAGF	<12>	HYFE	<11>	HNVSQE		
hST3Gal V	136	CRR	CVVIGSGGILHGLEL	GHTLNQ	FDVVI	RLNSAP	VEG-YSEHVG	NKTT	<99>	PTIG	VI	AVVLATHLC	DEVS	LAGF	<11>	HYFD	<12>	HNVTTE
hST3Gal VI	115	CKK	CVVVGNGGVLK	NKTLGEKIDSYD	VIR	MNNG	PVLG-HBEEVG	RRTT	<94>	PTGII	AITLAFYI	CH	EVHLAGF	<11>	HYYG	<12>	HNVTAE	
hST8Sia I	120	LKK	CAVVGNGGILKKSQC	GRQID	EANFV	MRCNLP	PLSSEYTKD	VGSKSQ	<89>	LSTGL	FLVSAALGL	CEEVA	IYGF	<14>	HYDD	<8>	HAMPPE	
hST8Sia II	154	FGT	CAIVGNSGVLLNSGC	QGEID	AHSFVIR	CNLP	APVQE-YARDVGL	KTD	<91>	PTG	L	MYTLATRF	CKQI	IYLYGF	<14>	HYDD	<12>	HTMPLE
hST8Sia III	159	YNI	CAVVGNSGILTFIQ	CGREIDKSD	FVRCN	FAPSEA-FORDVG	RKTN	<92>	LSTGIL	MYTLASAI	CEEI	IHYLYGF	<15>	HYDD	<13>	HQLPAE		
hST8Sia IV	139	FKT	CAVVGNSGILLDSE	CGKEIDSHNF	VIR	CNLP	APVVE-FAADV	TKSD	<91>	PSTGL	L	MYTLATRF	CEI	IHYLYGF	<14>	HYDD	<12>	HRMPLE
hST8Sia V	161	FKK	CAVVGNSGILKNSRC	GREIN	SAD	FVRCNLP	PISEKYTMD	VGVKTD	<89>	ISTGL	ILVTA	ALELCE	EVH	LYGF	<14>	HYDD	<8>	HAMPSE
hST8Sia VI	184	YNQ	CAVVGNGGILNKSLC	GAEIDKSD	FVRCNLP	PTTGDVSK	DVGSKTN	<89>	LSTGL	M	IASVAVEL	CKNV	KLYGF	<14>	HYDD	<8>	HQMPKE	

Figure 18 : Les motifs conservés des sialyltransférases humaines (d'après Jeanneau *et al.*, 2004). Alignement de séquences des régions les plus conservées des sialyltransférases. Les acides aminés strictement conservés sont indiqués en rouge, lorsqu'ils sont partiellement conservés en bleu. Les chiffres verts de gauche indiquent la position dans la séquence protéique, les autres le nombre d'acides aminés séparant 2 motifs conservés.

Le sialylmotif L est constitué de 48 ou 49 acides aminés dont 5 invariants (Figure 18) et se situe au début du domaine catalytique. Le sialylmotif S est composé de 23 acides aminés dont 2 parfaitement conservés entre les différentes enzymes. Il se situe une centaine d'acides aminés en aval du sialylmotif L. Ces deux premiers motifs semblent tout deux participer à la liaison avec le substrat donneur mais seul le sialylmotif S paraît impliqué dans la formation de la liaison avec le substrat accepteur (Datta *et al.*, 1995 ; 1998). Par ailleurs on note la présence d'une cystéine parmi

les acides aminés strictement conservés dans chacun de ces deux motifs (Figure 18). Séparées d'environ 150 acides aminés l'une de l'autre, elles permettent la formation d'un pont disulfure nécessaire au maintien du site catalytique dans une conformation optimale pour l'enzyme (Datta *et al.*, 2001). Plus récemment découvert, le sialylmotif III, constitué de seulement 4 acides aminés dont une tyrosine (Y) invariante, vient s'intercaler entre les sialylmotifs S et VS (Jeanneau *et al.*, 2004) (Figure 18). Enfin, le dernier sialylmotif à ce jour connu, le sialylmotif VS, est très proche de l'extrémité C-terminale. Composé par d'une courte séquence de 6 acides aminés, il se caractérise par deux résidus strictement conservés, une histidine (H) et un acide glutamique (E), toujours séparés l'un de l'autre par 4 acides aminés (Geremia *et al.*, 1997) (Figure 18). Alors que nous avons préalablement vu que les motifs L et S étaient impliqués dans la reconnaissance et la liaison avec les substrats accepteurs et donneurs, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer l'importance des motifs III et VS dans le mécanisme catalytique (Geremia *et al.*, 1997 ; Jeanneau *et al.*, 2004).

2.1.2. CMP-Sia... un substrat donneur unique ?

Une chose est sûre, les acides sialiques ont la particularité d'être les seuls monosaccharides à être retrouvés sous leur forme activée liés à une molécule de cytidine monophosphate (CMP), les autres oses étant associés à une molécule de guanidine diphosphate (GDP-Man, GDP-Fuc) ou autre uridine diphosphate (UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc...). Mais peut-on vraiment dire qu'il n'existe qu'un seul type de substrat donneur pour les sialyltransférases ?

En effet, sous le terme général d'acide sialique est regroupée toute une famille de monosaccharides ayant en commun un squelette à 9 carbones correspondant à l'acide 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonique, abrégé en « Neu », et dont les premiers membres furent identifiés dans les années 30 (discuté dans Blix *et al.*, 1957). Les acides sialiques les plus fréquemment retrouvés chez les mammifères sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (Figure 19) mais il est important de noter que des réactions d'acétylation, sulfonation, lactonisation, lactamisation, etc... peuvent également avoir lieu au niveau des carbones C4, C5, C7, C8 et C9. Ces différentes et subtiles réactions font qu'il existe plus de 50 acides sialiques différents d'occurrence plus ou moins importante.

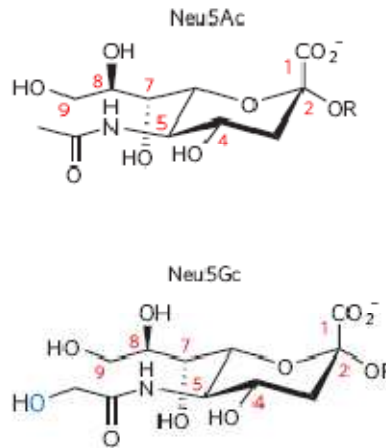


Figure 19 : Les principaux acides sialiques retrouvés chez les mammifères, l'acide N-acétyl neuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolyneuraminique (Neu5Gc). Les chiffres en rouge représentent les numéros des carbones du squelette commun des acides sialiques. R représente le reste de la chaîne glycanique sur laquelle l'acide sialique est fixé. L'unique différence entre ces deux monosaccharides réside dans la présence d'un atome d'oxygène (représenté en bleu) supplémentaire au niveau du groupement N-glycolyl (d'après Varki, 2007).

2.1.2.1. Biosynthèse du substrat donneur CMP-Sia

Tous les acides sialiques dont nous avons parlé dans le paragraphe précédent sont des dérivés du Neu5Ac. Comme la plupart des monosaccharides, le point de départ de la voie de biosynthèse *de novo* du Neu5Ac passe par le glucose. En effet, chez les vertébrés, le glycosylnucléotide UDP-GlcNAc est pris en charge par une enzyme bi-fonctionnelle, l'UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc kinase, qui va d'abord assurer la transformation de la GlcNAc en ManNAc puis immédiatement phosphoryler cette dernière sur son carbone 6 pour donner une ManNAc-6-P (Figure 20) (Hinderlich *et al.*, 1997 ; Stasche *et al.*, 1997). L'étape suivante consiste à l'obtention du squelette de 9 carbones des acides sialiques. Il est le résultat de la condensation de la N-acétylmannosamine-6-phosphate avec une molécule de phosphénolpyruvate (PEP) pour donner du Neu5Ac-9-P (Figure 20), cette réaction étant catalysée par la Neu5Ac 9-phosphate synthase (NPS) (Lawrence *et al.* 2000 ; Nakata *et al.* 2000). Il ne reste alors qu'à déphosphoryler le Neu5Ac-9-P pour obtenir le Neu5Ac (Figure 19). Toutes ces étapes de la biosynthèse se déroulent dans le cytosol des cellules.

L'acide N-acétylneuraminique obtenu doit être activé afin de pouvoir être transféré sur les chaînes glycaniques. L'activation sous forme de glycosylnucléotide est réalisée en présence de CTP et est catalysée par une enzyme localisée dans le noyau des cellules (Kean *et al.*, 2004), la CMP-Neu5Ac synthétase (Figure 20). Le CMP-Neu5Ac néo-synthétisé peut alors devenir le substrat de toute une batterie d'enzymes ayant pour but de lui apporter diverses modifications structurales. A titre

d'exemple, c'est à ce niveau que l'acide N-glycolylneuraminique est formé grâce à l'action d'une hydroxylase/monooxygénase, la CMPNeu5Ac hydroxylase (CMAH) qui ajoute un groupement hydroxyle supplémentaire sur le groupement acyl en C5 du Neu5Ac (Schoop *et al.*, 1969 ; Schauer *et al.*, 1970). Chez l'homme il existe une délétion de 92 paires de bases dans l'exon 6 de ce gène provoquant un arrêt prématuré de la traduction, et donc, la production d'une protéine inactive (Irie *et al.*, 1998). Retrouvée à l'état homozygote dans toutes les populations humaines et n'ayant pas pu être mise en évidence dans d'autres espèces (Chou *et al.*, 1998), elle permet d'expliquer l'absence d'acide N-glycolylneuraminique chez l'homme.

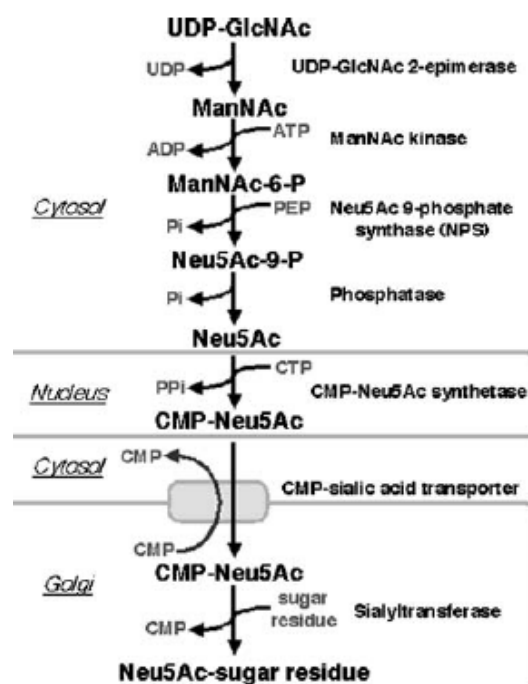


Figure 20 : Voie de biosynthèse *de novo* de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac). La formation du monosaccharide à proprement parlé s'effectue dans le cytosol à partir de l'UDP-GlcNAc. L'UDP-GlcNAc 2-épipérase et la ManNAc kinase font partie du même complexe enzymatique. L'assemblage du glycosynucléotide CMP-NeuAc s'effectue au niveau du noyau des cellules. C'est également au niveau de ce noyau et une fois que le glycosynucléotide est assemblé que l'acide sialique pourra subir des modifications structurales de type acétylation, etc... Le transport du glycosynucléotide dans l'appareil de Golgi où il sera utilisé par les sialyltransférases nécessite la présence d'un transporteur d'acide sialique (d'après Inoue et Katajima, 2006).

La biosynthèse des différents types d'acides sialiques pouvant être utilisé comme substrat donneur par les sialyltransférases est achevée dans le noyau. Les glycosyl-nucléotides obtenus sont ensuite acheminés dans l'appareil de Golgi où ils seront utilisés par les sialyltransférases grâce à un transporteur d'acide sialique (Figure 20) (Higa et Paulson, 1985).

2.1.2.2. Pourquoi avoir une telle diversité structurale ?

En position terminale des chaînes glycaniques, les acides sialiques sont très exposés et peuvent être reconnus par de nombreuses molécules. Interactions avec qui ? D'abord et surtout avec des lectines endogènes telles que les sélectines et les Siglecs dont les rôles sont divers et variés. Ainsi, l'une des raisons permettant d'expliquer la très grande diversité structurale de ces oses est la modulation des interactions lectine-glycane, et, de ce fait, des conséquences physiologiques qui en découlent. A titre d'exemple, la Siglec-2 également appelée CD22, impliquée dans l'activation du lymphocyte B, a une spécificité plus forte pour le Neu5Gc que pour le Neu5Ac chez la souris (Van der Merwe *et al.*, 1996). A l'inverse, les Siglec-1/sialoadhésines humaine et murine, préfèrent le Neu5Ac au Neu5Gc (Brinkman-Van der Linden et Varki, 2000). Dans ce contexte, il est également intéressant de citer le cas de l'interleukine-4 qui ne pourra se fixer à sa cible qu'à la condition que celle-ci présente un monosaccharide rare, le Neu1,7-lactone (Mitsuoka *et al.*, 1999). D'autres modifications des acides sialiques peuvent servir à le masquer et inhiber de fait l'interaction avec la lectine. C'est ainsi que la 9-O-acétylation du Neu5Ac bloque sa reconnaissance par le CD22 (Sjoberg *et al.*, 1994), et que la lactamisation du Neu5Ac (Neu1,5-lactam) inhibe sa reconnaissance par la L-sélectine (Mitsuoka *et al.*, 1999). Ces exemples nous montrent que ces lectines reconnaissent préférentiellement certaines structures mais qu'elles peuvent tout de même former des interactions de moindre force avec d'autres structures différemment sialylées.

Malheureusement, cette localisation préférentielle des acides sialiques à la surface des cellules n'a pas que des avantages. En effet, ils sont la cible d'un grand nombre de pathogènes tels que le virus de la grippe (Xu *et al.*, 1994), la bactérie *Helicobacter pylori* (Miller-Podraza *et al.*, 1997), le protozoaire *Plasmodium falciparum* (Orlandi *et al.*, 1992), ou encore de toxines bactériennes comme celle produite par *Clostridium tetani* (MacKenzie *et al.*, 1997). Les structures de fixation de ces pathogènes sont bien souvent les mêmes que celles utilisées par les lectines endogènes, toutefois il semblerait que ces dernières, dont beaucoup sont associées au système immunitaire, tolèrent un certain degré de fluctuation structurale de leurs ligands (Crocker et Varki, 2001). Ainsi, le changement d'un Neu5Ac par un Neu5Gc permettrait à la cellule hôte d'échapper à l'infection par un pathogène, ou tout du moins de la limiter, sans pour autant compromettre la fonction endogène résultant de l'interaction lectine-acide sialique (Figure 21).

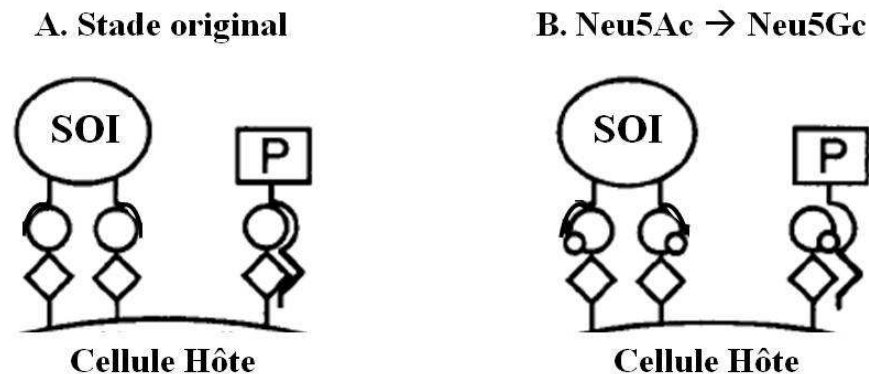


Figure 21 : Effets de la modification structurale des acides sialiques sur leur reconnaissance par des lectines endogènes/exogènes (d'après Angata et Varki, 2002). P = pathogène. En A, les structures glycaniques de la cellule hôte sont reconnues à la fois par des lectines endogènes (partie gauche) et par des lectines exogènes (partie droite). En B, les lectines endogènes tolèrent un certain degré de fluctuation structurale de leur ligand. Ainsi, le passage du Neu5Ac au Neu5Gc n'affecte pas l'interaction lectine-sucre (partie gauche) alors que dans le cas des lectines exogènes, dont la spécificité de ligand est plus importante, l'interaction ne s'effectue plus correctement avec la cellule hôte (partie droite).

2.1.3. La famille des ST3Gal

Comme leur nom l'indique, les ST3Gal ou β -galactoside- α 2,3-sialyltransférases sont des enzymes qui greffent un résidu d'acide sialique sur le carbone 3 d'un galactose. Six enzymes appartenant à cette famille ont été identifiées à la fois chez l'homme et la souris. En plus des quatre sialylmotifs communs aux différentes sialyltransférases, les ST3Gal présentent deux régions situées entre les sialylmotifs L et S qui leurs sont spécifiques (Patel et Balaji, 2006) (Figure 22). Alors que les sialylmotifs L, S, III et VS contribuent aux fonctions communes des sialyltransférases, ces deux motifs spécifiques joueraient un rôle important pour la formation de la liaison en α 2,3 mais aussi dans la reconnaissance de l'ose acceptant l'acide sialique. Bien que les 6 enzymes de cette famille contiennent ces 2 motifs additionnels, une analyse comparative de leurs séquences protéiques, de leurs spécificités de substrats ainsi que de l'organisation structurale des gènes qui les codent a permis de les classer en deux sous-familles distinctes.

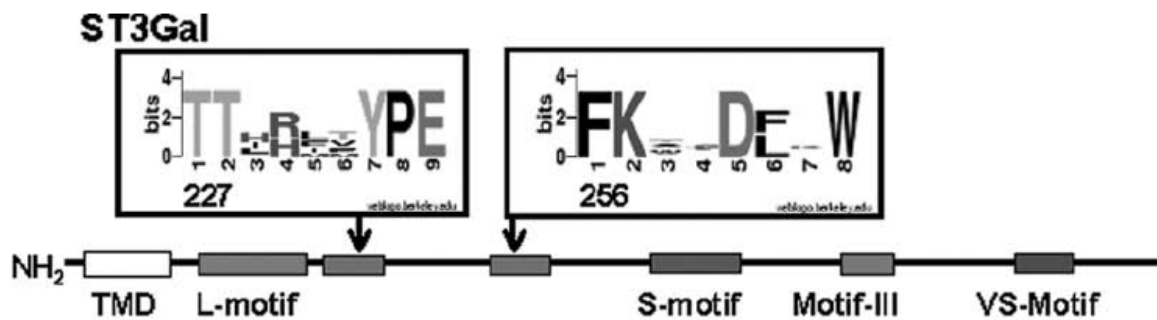


Figure 22 : Les motifs spécifiques de la sous-famille des ST3Gal (d'après Patel et Balaji, 2006). Les rectangles au dessus de la représentation schématique de la protéine indiquent la position relative et la séquence de l'un et l'autre des motifs au niveau de la région conservée des enzymes. L'échelle des ordonnées dans ces rectangles correspond à l'état de conservation de chacun des acides aminés de chaque motif entre les différentes ST3Gal analysées.

La première de ces sous-familles est constituée de ST3Gal I et II. Leurs structures protéiques primaires présentent entre elles 47,1% d'identité contre seulement de 20 à 39% avec ST3Gal III et IV. ST3Gal I et II utilisent toutes deux le même type de substrat accepteur, à savoir l'oligosaccharide Gal β 1,3GalNAc, mais la première utilisera préférentiellement celui-ci lorsqu'il est porté par les *O*-glycannes des glycoprotéines (dont les cores 1 et 2), contrairement à ST3Gal II, qui elle, le préfère lorsqu'il est présent sur les glycolipides. Par ailleurs, l'étude de souris KO pour *ST3Gal I* a montré que l'enzyme codée par ce gène est responsable de la sialylation du core 1 des *O*-glycannes des lymphocytes T, cette structure glycanique sialylée jouant un rôle très important dans l'engagement ou non des cellules T CD8⁺ en apoptose (Priatel *et al.*, 2000).

Outre une spécificité de substrat accepteur identique, les gènes *ST3Gal I* et *ST3Gal II* présentent une organisation structurale similaire au niveau de leurs régions codantes. En effet, que ce soit chez l'homme et la souris, le cadre ouvert de lecture se compose de 6 exons dont les tailles sont très comparables d'un gène à l'autre. De plus, le découpage exon-intron de ces gènes fait que les séquences codant respectivement les sialylmotifs L et S se retrouvent à cheval sur deux exons différents (Figure 23).

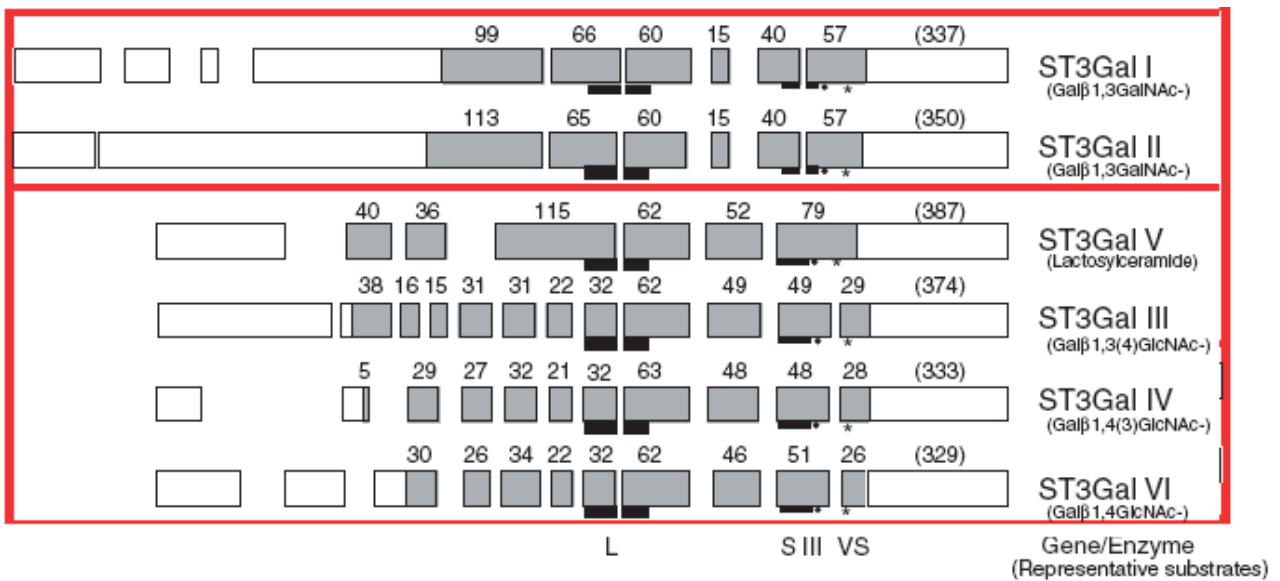


Figure 23 : Représentation des structures génomiques des ST3Gal chez la souris (d'après Takashima, 2008). Les gènes de la première sous famille sont représentés dans le rectangle du haut, ceux de la seconde dans le rectangle du bas. Les cadres grisés représentent les régions codantes alors que les exons non traduits sont représentés en blanc. Les chiffres précisent le nombre d'acides aminés codés par chacun des exons et les rectangles noirs indiquent les positions relatives des différents sialylmotifs (de gauche à droite, sialylmotifs L, S, III et VS). Entre parenthèses et en dessous du nom de chaque gène sont indiqués les substrats préférés de chacune des enzymes.

Le second groupe d'enzyme appartenant à la famille des ST3Gal se compose de quatre membres : ST3Gal III, IV, V et VI. Chez la souris, l'analyse comparative des séquences protéiques primaires les unes par rapport aux autres révèle un taux d'identité compris entre 35 et 41%. Ce faible taux d'identité entre les différentes séquences n'est pas suffisant pour pouvoir les regrouper en une seule famille. Dans ce cas, l'analyse de leurs propriétés enzymatiques et de leurs structures géniques s'avère essentielle (Kono *et al.*, 1997). En ce qui concerne leurs substrats accepteurs, ST3Gal III et ST3Gal IV ont la particularité de pouvoir utiliser à la fois les oligosaccharides de type I (Galβ1,3GlcNAc) et de type II (Galβ1,4GlcNAc) des glycoprotéines et également portés par des glycolipides. Ces deux enzymes semblent être impliquées dans la formation des antigènes de type Lewis. Il semble cependant que ST3Gal III utilise préférentiellement les oligosaccharides de type I à l'inverse de ST3Gal IV, qui a une affinité plus prononcée pour les oligosaccharides de type II. En effet, le KO du gène *ST3Gal IV* chez la souris a montré l'importance de cette enzyme dans la formation des ligands des sélectines (Ellies *et al.*, 2002). La spécificité de substrat de ST3Gal VI est quant à elle plus stricte puisqu'elle ne sera capable d'utiliser que les structures de type II (Galβ1,4GlcNAc), à la fois sur les glycoprotéines et les glycolipides. Les études menées sur cette enzyme montrent qu'elle serait surtout impliquée dans la synthèse de certains paraglobosides (Okajima *et al.*, 1999) et de la série α des gangliosides (Tsuchida *et al.*, 2003). Enfin, ST3Gal V,

également appelée GM3 synthase, est responsable de la synthèse du ganglioside GM3 à partir du lactosylcéramide.

Comme nous venons de le voir, ces 4 enzymes ne présentent pas les mêmes spécificités de substrat accepteur. Ainsi, ces propriétés ne suffisent pas à les classer dans la même sous-famille et c'est pourquoi il faut s'intéresser à l'organisation structurale des gènes qui les codent. L'observation des gènes *ST3Gal III, IV* et *VI*, que ce soit chez l'homme ou la souris, met en évidence de nombreuses similitudes (Figure 23). De manière générale, ces gènes présentent une structure plutôt morcelée pour des gènes sialyltransférases comprenant de 8 à 11 exons codants. Comme pour la première sous-famille de ST3Gal, le sialylmotif L est codé par une séquence située à cheval sur deux exons (Figure 23). Alors que cette scission est également retrouvée pour le sialylmotif S de ST3Gal I et II, la séquence codante de ce motif pour les gènes *ST3Gal III, IV* et *VI* est sur un seul exon. Ce même exon contient aussi la séquence du sialylmotif III. Pour aller plus loin dans la description de ces différentes structures géniques, il est intéressant de noter qu'à l'exception des exons codants les régions tiges, le découpage exon-intron de *ST3Gal III, IV* et *VI* est assez bien conservé. Bien que *ST3Gal V* ait une structure moins morcelée que celle observée pour *ST3Gal III, IV* et *VI*, Takashima (2008) montre cependant que sa filiation avec les 3 autres gènes devient évidente si les exons codants 3 et 6 sont coupés aux positions appropriées (Figure 23).

2.1.4. La famille des ST6Gal

Nous ne nous attarderons pas ici à détailler cette famille d'enzymes qui fait l'objet d'une étude plus approfondie au chapitre 2.2. Cette famille, dont le nom exact est β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase, a la particularité de ne comprendre que 2 membres, ST6Gal I et ST6Gal II, quand toutes les autres familles de sialyltransférases chez les mammifères sont constituées de six enzymes. Comme leur nom l'indique, les enzymes appartenant à ce groupe transfèrent un acide sialique sur le carbone 6 d'un résidu de galactose appartenant à un oligosaccharide de type lactosaminique (Gal β 1,4GlcNAc), celui-ci étant majoritairement porté par des *N*-glycannes.

ST6Gal I et II utilisent le même substrat accepteur que des enzymes de la famille des ST3Gal telles que ST3Gal III, IV et VI. De ce fait, ces différentes sialyltransférases entrent en compétition les unes avec les autres au niveau de la structure acceptrice. Le niveau d'expression d'épitopes Sialyl- α 2,6 et Sialyl- α 2,3-lactosamine sur les glycoprotéines dépend alors du niveau d'expression de

chacune de ces sialyltransférases ainsi que de leurs constantes cinétiques. En outre, au cours d'un certain nombre de processus physiologiques, les variations du rapport quantitatif entre ces deux structures glycaniques s'avère primordial, d'où la nécessité d'une régulation fine de ces β -galactoside-sialyltransférases.

2.1.5. La famille des ST6GalNAc

Cette nouvelle famille de sialyltransférases que nous allons décrire est, comme les précédentes, définie par les propriétés enzymatiques des membres qui la composent. Elle regroupe six enzymes qui participent au transfert de résidus d'acides sialiques sur les N-acétylgalactosamines des glycochaînes par une liaison en α 2,6. Comme pour les ST3Gal cette famille se subdivise en plusieurs groupes. La nature de la molécule portant la chaîne oligosaccharidique semble très importante puisque ST6GalNAc I, II et IV utilisent comme substrat accepteur les O-glycosylprotéines contrairement à ST6GalNAc III, V et VI qui elles sialylent les chaînes glycaniques des lipides (Harduin-Lepers *et al.*, 2001). Cependant une analyse plus approfondie des caractéristiques enzymatiques de l'ensemble des membres de cette famille révèle des spécificités de substrats très intéressantes. Il apparaît en effet que ST6GalNAc I et II catalysent tout autant le transfert d'un acide sialique sur les chaînes oligosaccharidiques de type Gal β 1,3GalNAc que sur des chaînes de type Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc, les deux types devant être portées par des glycoprotéines. De plus, la partie peptidique à proximité du glycanne influe sur la capacité de reconnaissance de l'accepteur et donc sur le niveau d'activité de ces enzymes. A l'inverse, la spécificité de ST6GalNAc III, IV, V et VI vis-à-vis de leurs structures acceptrices s'avère plus restrictive. Elles n'acceptent uniquement comme substrat accepteurs que des oligosaccharides sialylés de type Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc, portés par des glycolipides tel que le GM_{1b} pour ST6GalNAc III, V et VI ou des glycoprotéines pour ST6GalNAc IV.

Selon cette analyse, la subdivision en sous-familles des ST6GalNAc serait basée sur les spécificités de substrats de chacune des enzymes plus que par la nature de la molécule portant la chaîne glycanique. Il y aurait ainsi 2 sous-familles de ST6GalNAc, l'une composée de ST6GalNAc I et II, l'autre de ST6GalNAc III, IV, V et VI. Plusieurs approches, l'une se basant sur une approche phylogénétique (Harduin-Lepers *et al.*, 2005) et l'autre sur l'identification de séquences spécifiques des ST6GalNAc, ont été utilisées pour confirmer cette classification et sont arrivées aux mêmes conclusions. Bien évidemment, la séquence protéique primaire des 6 enzymes renferment les

caractéristiques générales des sialyltransférases à savoir la présence des quatre sialylmotifs L, S, III et VS. Dans le même état d'esprit que pour le travail qu'ils ont effectué pour les ST3Gal, Patel et Balaji (2006) ont recherché des motifs spécifiques de cette famille. Ces séquences existent bien, mais alors que les 2 motifs additionnels des ST3Gal sont communs à toutes les enzymes de la famille, la situation est différente chez les ST6GalNAc et confirme la classification préalablement établie à partir des propriétés enzymatiques (Figure 24). En effet, la première sous-famille, incluant ST6GalNAc I et II, contient 3 motifs spécifiques dont 2 sont situés entre les sialylmotifs L et S et le dernier en position C-terminale juste derrière le sialylmotif VS (Figure 24). Dans l'autre famille, regroupant les quatre autres enzymes, seules 2 séquences spécifiques situées entre les sialylmotifs L et S ont été identifiées.

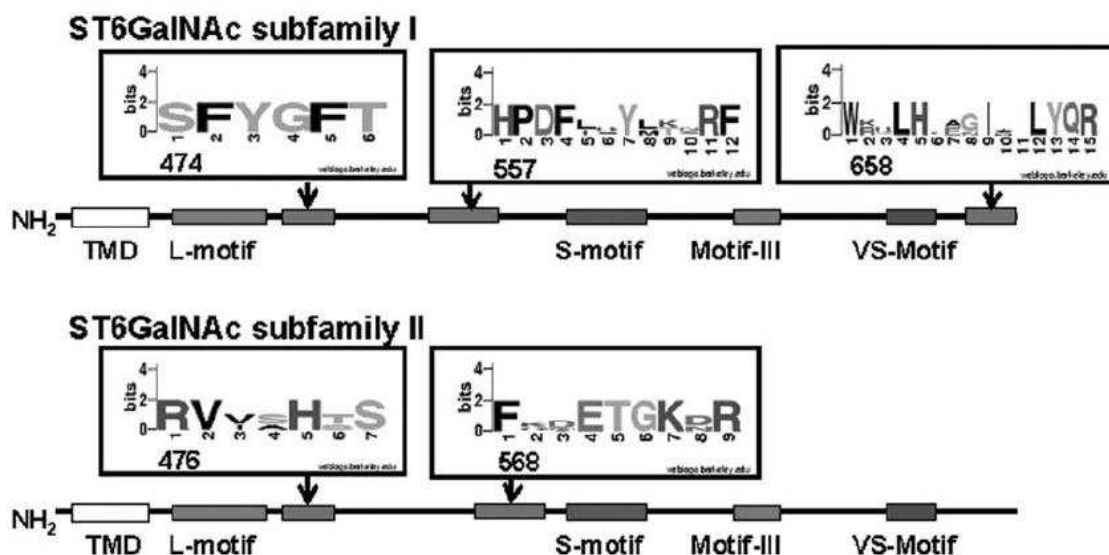


Figure 24 : Motifs spécifiques de chacune des deux sous-familles de ST6GalNAc (d'après Patel et Balaji, 2006). Les rectangles au dessus des représentations schématiques des protéines indiquent la position relative et la séquence de chaque motif dans les régions conservées des enzymes. La hauteur des lettres montrent l'occurrence de chaque acide aminé au sein des motifs dans le panel de séquences analysées.

A partir de la figure 24, la comparaison des séquences des motifs additionnels entre les deux sous-familles révèle très peu d'identité, une conclusion qui peut d'ailleurs être étendue à la globalité des séquences. En effet, l'alignement des séquences murines de ST6GalNAc I et II avec celles des autres ST6GalNAc murines montre qu'il y a moins de 27% d'identité

Ainsi, la séparation en deux groupes des ST6GalNAc paraît évidente et est renforcée par l'analyse de l'organisation des structures géniques qui les codent. *ST6GalNAc I* et *II* sont des gènes dont la structure est plutôt morcelée et qui se ressemblent énormément dans leur découpage exon/intron

(Figure 25). De façon caractéristique et comme pour *ST3Gal I* et *II*, ce premier groupe de *ST6GalNAc* présente une division des séquences codantes des sialylmotifs L et S par des introns. Notons aussi que ces 2 gènes ont une localisation chromosomique extrêmement proche et qu'il existe entre ces deux séquences un pseudogène présentant de fortes similitudes avec *ST6GalNAc I*, cette particularité étant tout autant observée chez l'homme que chez la souris.

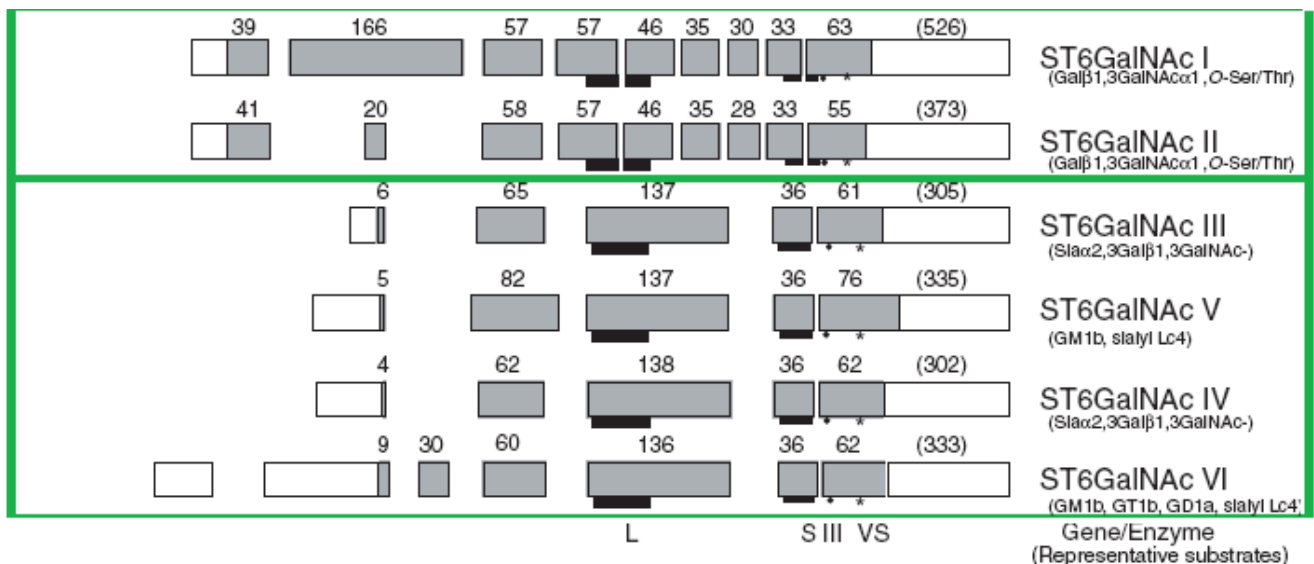


Figure 25 : Représentation schématique des gènes codant les ST6GalNAc murines (d'après Takashima, 2008). Chaque rectangle gris représente les exons codants, les rectangles blancs les exons non codants. Les lignes noires indiquent la localisation des séquences codant les sialylmotifs et les chiffres au dessus le nombre d'acides aminés codés par chacun des exons. Les substrats préférentiels de chaque sialyltransférases sont indiqués entre parenthèses en dessous du nom des gènes.

Dans l'autre sous-famille, la structure génique est également très remarquable. Ces gènes sont moins morcelés que *ST6GalNAc I* et *II* et la taille des différents exons apparaît bien conservée. Les premiers exons de chaque ORF ne codent que pour un nombre très limité d'acides aminés et contrairement au premier groupe, les séquences des sialylmotifs L et S ne sont pas séparées par une séquence intronique (Figure 25). Que ce soit chez l'homme ou la souris, la localisation chromosomique de *ST6GalNAc III*, *IV*, *V* et *VI* s'avère tout aussi intéressante que celle que nous avons précédemment décrite pour *ST6GalNAc I* et *II*. En effet, *ST6GalNAc III* et *V* sont portés par le même chromosome, très proches l'un de l'autre et cette situation est également retrouvée pour *ST6GalNAc IV* et *VI* portés par un autre chromosome. Ainsi, le fait que les gènes des ST6GalNAc d'une même sous-famille se retrouvent associés par paires dans les génomes humain et murin suggère fortement qu'ils proviennent de phénomènes de duplication en tandem au cours de l'évolution.

2.1.6. La famille des ST8Sia

Les ST8Sia constituent la dernière famille de sialyltransférases et sont au nombre de six chez les mammifères. A l'instar des enzymes des autres familles, elles sont identifiables par la présence dans leur structure primaire de motifs qui leur sont propres en plus des sialylmotifs L, S, III et VS (Figure 26). Le premier de ces motifs est constitué de 10 acides aminés et se situe juste en aval du sialylmotif L (Patel et Balaji, 2006), le second, récemment identifié (Harduin-Lepers *et al.*, 2008), se situe en position C-terminale d'où le nom de motif C-term et se compose de 10 acides aminés dont une cystéine parfaitement conservée entre les différentes enzymes de la famille. Cette cystéine va former avec une autre cystéine conservée du sialylmotif L un pont disulfure intramoléculaire qui est essentiel au bon repliement tridimensionnel et à l'activité des ST8Sia (Angata *et al.*, 2001).

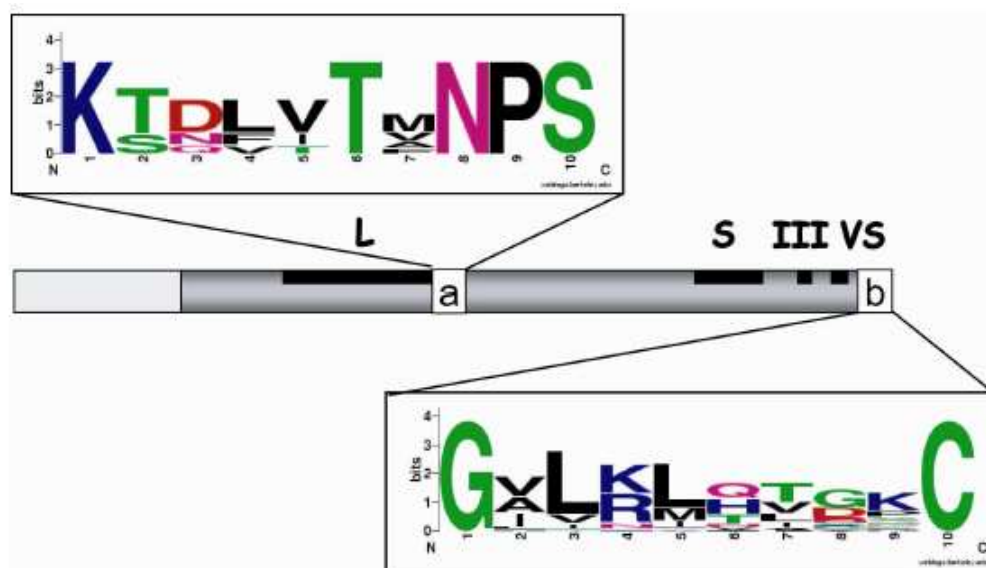


Figure 26 : Les motifs spécifiques des ST8Sia (d'après Harduin-Lepers *et al.*, 2008). Position relative sur la protéine du motif décrit par Patel et Balaji (a) et du motif C-term (b) (Harduin-Lepers *et al.*, 2008). La taille relative des acides aminés correspond à l'état de conservation de chacun pour chaque position du motif. Lorsque deux acides aminés sont superposés, leur hauteur indique la fréquence relative à laquelle ils apparaissent à cette position. Les acides aminés polaires sont représentés en vert, basiques en bleu, acides en rouge, hydrophobes en noir et neutres en rose.

Toutes ces sialyltransférases ont la capacité de transférer un acide sialique lié en α 2,8 sur un autre acide sialique. Cependant, la comparaison de leurs structures géniques et protéiques, et de leurs spécificités de substrats révèlent la subdivision de cette famille en deux groupes de trois membres. La première sous-famille regroupe ST8Sia I, V et VI qui présentent les unes par rapport aux autres de 38 à 44% d'identités. ST8Sia I et V sont des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse des

gangliosides. En effet, ST8Sia I, également connue sous le nom de GD3 synthase, permet la formation du GD3, le précurseur des gangliosides des séries b et c dont beaucoup sont impliqués dans des processus biologiques comme l'adhésion cellulaire ou l'apoptose (Okada *et al.*, 2002). ST8Sia V est quant à elle impliquée dans la formation des gangliosides de type GD1c, GT3 GQ1b et GT1a (Kono *et al.*, 1996). Le dernier membre de ce groupe, ST8Sia VI, n'a qu'une très faible activité sur les glycolipides et est en revanche responsable de la formation des motifs disialylés présents sur les *O*-glycosylprotéines (Teinturier-Lelièvre *et al.*, 2005).

L'autre sous famille de ST8Sia, composée de ST8Sia II, III et IV, englobe des enzymes capables d'effectuer de l'oligo ou de la polysialylation, c'est-à-dire de constituer des chaînes plus ou moins longues d'acides sialiques (PSA) en position terminale des glycanes. Chez les mammifères, l'exemple type de protéines présentant ces PSA sont essentiellement les NCAMs et de rares autres protéines comme la sous unité α du canal sodique voltage dépendant (Zuber *et al.*, 1992) et la protéine CD36 du lait (Yabe *et al.*, 2003). ST8Sia II et IV ont en commun près de 67% de leurs acides aminés et sont toutes deux impliquées dans la polysialylation des glycoprotéines. Il apparaît cependant que ST8Sia IV catalyse la formation de PSA plus longues que celles produites par ST8Sia II (Angata *et al.* 2002). Par ailleurs, l'analyse de souris KO pour l'un ou l'autre des gènes codant ces enzymes présentent des phénotypes différents. Il semble que les PSA produits par ST8Sia II joueraient un rôle au niveau des processus comportementaux et de la mémorisation alors que les PSA synthétisés par ST8Sia IV seraient impliqués dans la plasticité neuronale. Les propriétés enzymatiques de ST8Sia III sont assez différentes des deux autres. En effet, elle reconnaît les structures NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc des *N*-glycanes et des glycolipides sur lesquelles elle ne greffera qu'un seul acide sialique. Par contre, bien qu'elle soit incapable de synthétiser les PSA de la NCAM, elle possède une activité de polysialylation sur ses propres antennes glycaniques, on parle alors d'autopolysialylation (Angata *et al.*, 2000). Enfin, elle est uniquement exprimée au cours du développement dans le cerveau et les testicules (Yoshida *et al.*, 1995).

En plus des deux motifs spécifiques des ST8Sias, les trois polysialyltransférases décrites dans le paragraphe précédent présentent dans leurs séquences des motifs spécifiques supplémentaires. Il y a en amont du sialylmotif S de ST8Sia II et IV un motif de 32 acides aminés (Figure 28), dénommé domaine de polysialylation (PSTD), qui est impliqué dans l'élongation des chaînes linéaires d'acides sialiques (Nakata *et al.*, 2006). Ce motif n'est pas retrouvé sur ST8Sia III mais la

comparaison des séquences de différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés (Harduin-Lepers *et al.*, 2008) a permis l'identification d'un motif similaire de 52 acides aminés (motif III-2) situé juste en amont du sialylmotif S (Figure 27). Enfin, il existe un dernier motif de 10 acides aminés (motif III-1) retrouvé dans toutes les ST8Sia III qui se positionne en amont du sialylmotif L. La fonction de ces deux motifs n'a pas encore été mise en évidence.

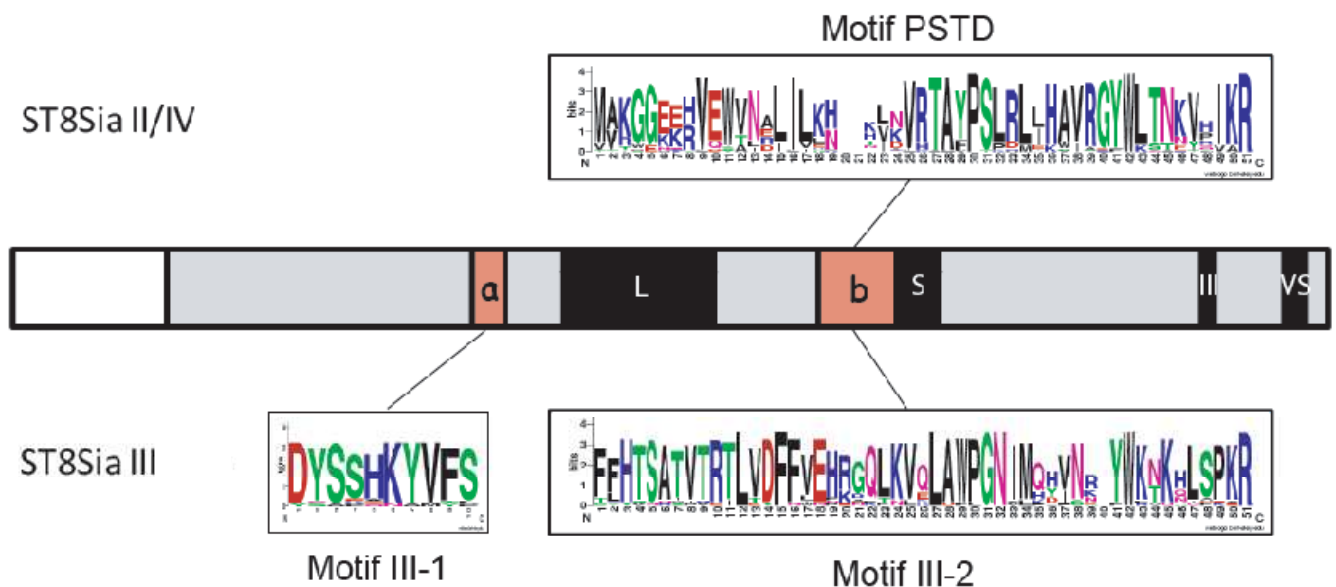


Figure 27 : Les motifs spécifiques des polysialyltransférases ST8Sia II, III et IV (d'après Harduin-Lepers *et al.*, 2008). Le domaine catalytique des sialyltransférases est représenté par le rectangle gris et les sialylmotifs L, S, III et VS par les rectangles noirs. Les rectangles a et b indiquent la position relative sur la protéine des motifs spécifiques de ces enzymes. La taille relative des acides aminés correspond à l'état de conservation de chacun pour chaque position du motif. Lorsque deux acides aminés sont superposés, leur hauteur indique la fréquence relative à laquelle ils apparaissent à cette position. Les acides aminés polaires sont représentés en vert, basiques en bleu, acides en rouge, hydrophobes en noir et neutres en rose.

La subdivision en deux sous familles des ST8Sia se retrouve également au niveau des structures géniques. En effet, les gènes *ST8Sia I*, *V* et *VI* ont des structures plus morcelées que celles de *ST8Sia II*, *III* et *IV* (Figure 28). Pour tous ces gènes, la séquence codant le sialylmotif L se situe à cheval sur 2 exons, et, dans un même groupe, la taille des exons codants les domaines catalytiques est très bien conservée à l'exception de *ST8Sia III*. Cependant, en découplant ce troisième exon codant de *ST8Sia III* à une position appropriée, la filiation avec les gènes *ST8Sia II* et *IV* devient évidente (Takashima, 2008).

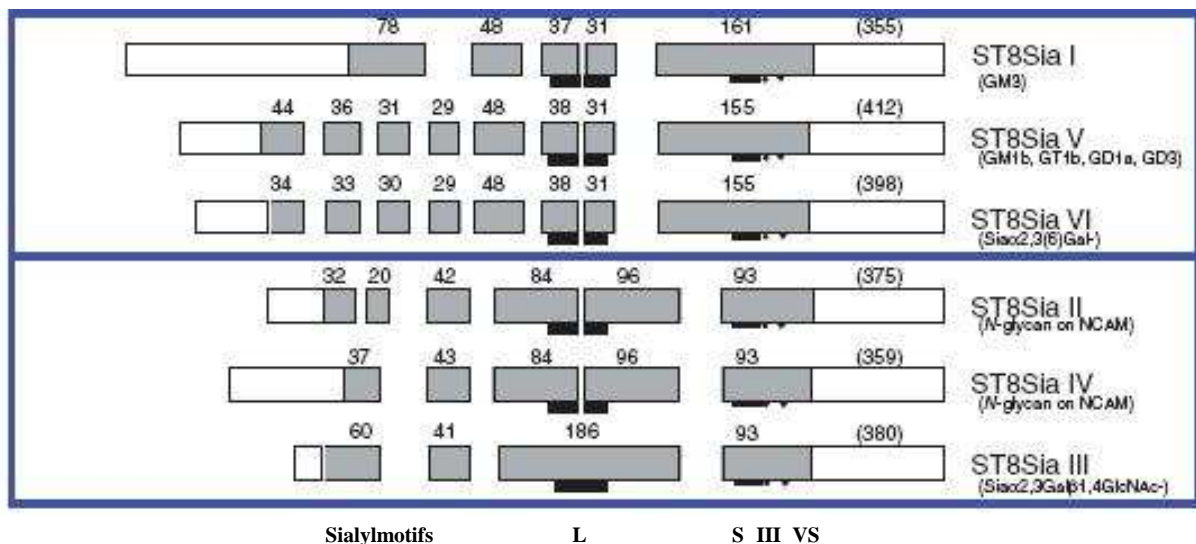


Figure 28 : Représentation schématique des gènes codant les ST8Sia murines (d’après Takashima, 2008). Chaque rectangle gris représente les exons codants, les rectangles blancs les exons non codants. Les lignes noires indiquent la localisation des séquences codant les sialylmotifs et les chiffres au dessus le nombre d’acides aminés codés par chacun des exons. Les substrats préférés de chaque sialyltransférases sont indiqués entre parenthèses en dessous du nom des gènes.

2.2. L’épitope Sialyl- α 2,6-lactosamine

Le disaccharide Gal β 1,4GlcNAc, autrement appelé lactosamine, est un constituant communément retrouvé sur les antennes des N-glycannes mais peut également être retrouvé sur les chaînes O-glycanniques et les glycolipides. Cette lactosamine est très souvent retrouvée sous une forme sialylée, soit en α 2,3 si elle est prise en charge par une enzyme de la famille des ST3Gal, soit en α 2,6 si elle subit l’action d’une ST6Gal. L’apparition de ce motif Sialyl- α 2,6-Lactosamine et les fonctions dont il est responsable sont donc étroitement liées à la présence et à la régulation des β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases.

2.2.1. Les ST6Gal ou β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases

2.2.1.1. Spécificité de substrat et organisation protéique

Les deux enzymes de cette famille de sialyltransférase, ST6Gal I et II, peuvent former le motif Sia $_6$ LacNAc, que celui-ci soit porté par des glycoprotéines (asialo orosomucoïde, asialofétuine) ou

des oligosaccharides libres (Tableau III). Malgré cette structure glycanique acceptrice identique, il est apparu que ces deux sialyltransférases présentent des caractéristiques enzymatiques différentes. En effet, ST6Gal I utilise préférentiellement les structures *N*-glycanniques des glycoprotéines alors que ST6Gal II se voit beaucoup plus efficace sur des structures oligosaccharidiques libres (Takashima *et al.* 2002 ; Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003). De manière intéressante, une étude récente (Rohfritsch *et al.* 2006) a déterminé que le substrat préférentiel de la ST6Gal II humaine n'était pas le motif LacNAc (Gal β 1,4GlcNAc) mais le motif LacdiNAc (GalNAc β 1,4GlcNAc), une structure oligosaccharidique rare chez les mammifères et sur laquelle ST6Gal I n'a qu'une faible activité chez l'homme (Rohfritsch *et al.* 2006) ou encore le bovin (Mercier *et al.*, 1999).

Tableau III : Comparaison des spécificités de substrats de hST6Gal I et II (d'après Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003). Les résultats sont donnés en pourcentage relatif de transfert d'acide sialique sur les différentes structures acceptrices, en prenant comme référence le transfert sur l'asialo-orosomucoïde.

Accepteur	Structures	Activité relative (%)	
		hST6Gal-I	hST6Gal-II
Asialo orosomucoïde	Gal β 1-4GlcNAc-R	100	100
Orosomucoïde	NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-R	0	0
Asialofetutine	Gal β 1-4GlcNAc-R	83	66
	Gal β 1-3GalNAc α -O-SerThr		
Oligosaccharides libres	Gal β 1-3GlcNAc	0	0
	Gal β 1-4GlcNAc	87	692
	LNT : Gal β 1-4GlcNAc β α -3Gal β 1-4Glc	120	623
	LNT : Gal β 1-3GlcNAc β α -3Gal β 1-4Glc	0	0

R, représente le reste de la chaîne *N*-glycosidique
 LNnT= Lacto-N-néotétraose
 LNT= Lacto-N-tétraose

L'analyse comparative des séquences des différentes ST6Gal I connues chez les mammifères révèlent un fort pourcentage d'identité de séquence inter-espèces. A titre d'exemple, la protéine bovine présente respectivement 83 et 75% d'identité de séquence avec les protéines humaine et murine (Mercier *et al.*, 1999). Cet état de conservation inter-espèces est donc supérieur à celui observé entre ST6Gal I et II puisque, chez l'homme, ces deux enzymes n'ont en commun que 48% de leurs acides aminés et ce uniquement au niveau des domaines catalytiques (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003). Cependant, d'un point de vue structural, ST6Gal I et II partagent la structure

caractéristique des sialyltransférases golgiennes à savoir celle des glycoprotéines transmembranaires de type II. Elles possèdent donc un court domaine N-terminal cytoplasmique, une région transmembranaire prolongée par un domaine luminal, lui même constitué d'une région tige et d'un domaine C-terminal catalytique renfermant les sialylmotifs (Figure 29). La principale différence structurale entre ces deux protéines réside au niveau de leurs régions tiges, celle de ST6Gal I étant plus courte d'une centaine de résidus que celle de ST6Gal II.

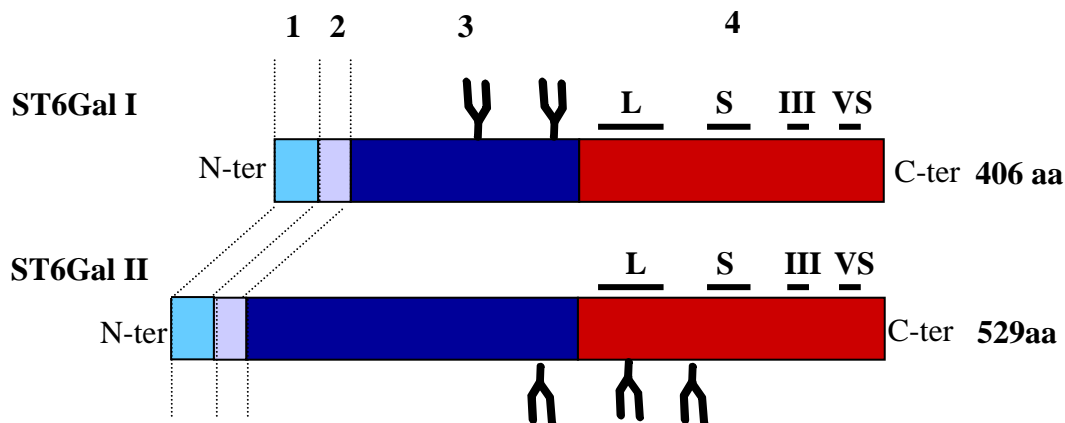


Figure 29 : Comparaison des structures protéiques des ST6Gal humaines. Représentation schématique des chaînes peptidiques de ST6Gal I et ST6Gal II avec en 1 le domaine cytosolique, en 2 le domaine transmembranaire, en 3 la région tige et en 4 le domaine catalytique. Y représente les sites potentiels de N-glycosylation. Les traits noirs au dessus des protéines indiquent la position relative des sialylmotifs.

Chez le rat, deux isoformes de ST6Gal I qui ne diffèrent qu'au niveau de l'acide aminé 123 du domaine catalytique existent de façon naturelle. Ces deux enzymes proviennent d'un phénomène « d'editing » de l'ARNm qui change le codon TAC codant pour une tyrosine en un codon TGC qui code pour une cystéine (Ma *et al.*, 1997). Ce simple changement ne conduit pas à une modification apparente de l'activité de l'enzyme mais semble par contre provoquer un changement de sa localisation cellulaire. En effet, la forme STtyr est sensible au clivage protéolytique et se retrouve sécrétée dans le milieu extérieur, la forme STcys qui reste résidente de l'appareil de Golgi a une tendance à former des complexes oligomériques (Fenteany et Colley, 2005).

Comme il l'avait été observé dans les autres familles de sialyltransférases, les β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases présentent au niveau de leurs séquences primaires des motifs qui leurs sont propres en plus des traditionnels sialylmotifs L, S, III et VS. Au nombre de trois (Figure 30), ils sont respectivement situés en amont du sialylmotif L, en aval du sialylmotif S et entre les

sialylmotifs III et VS (Patel et Balaji, 2006). Leur fonction n'a pas encore été clairement identifiée mais il semble qu'ils pourraient jouer un rôle au niveau de la spécificité de la reconnaissance des substrats accepteurs. Ils pourraient donc être à l'origine des différences d'activité observées entre ST6Gal I et II.

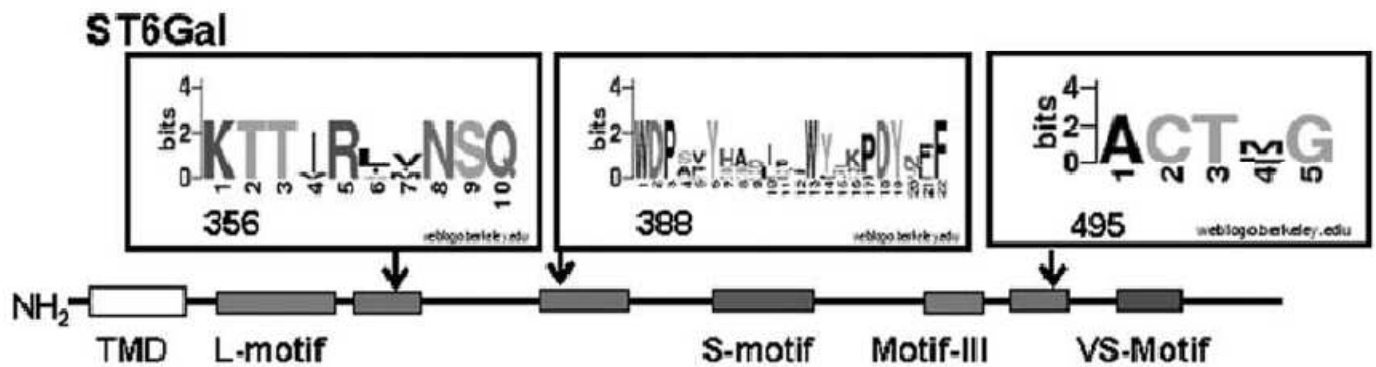


Figure 30 : Motifs spécifiques des ST6Gal (d'après Patel et Balaji, 2006). Les rectangles au dessus des représentations schématiques des protéines indiquent la position relative et la séquence de chaque motif dans les régions conservées des enzymes. La taille des lettres représente l'état de conservation de l'acide aminé et lorsqu'il y a plusieurs acides aminés possibles, la fréquence de représentation de chacun est traduite par leurs tailles relatives.

Enfin, ces sialyltransférases sont potentiellement glycosylées. Chez l'homme par exemple, ST6Gal I contient deux sites de *N*-glycosylation dans la région tige (Figure 29) qui ont été montrés comme essentiel au bon adressage de la protéine dans l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 2000). La ST6Gal II humaine renferme dans sa séquence trois sites potentiels de *N*-glycosylation dont le degré d'occupation n'a pas encore été déterminé. Il est cependant intéressant de noter que deux de ces sites bornent le sialylmotif L.

2.2.1.2. Organisation génomique des β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases

A. Le gène ST6Gal I

L'enzyme ST6Gal I ayant été la première sialyltransférase purifiée, de nombreuses études ont été menées pour déterminer la structure du gène qui la code et ce pour plusieurs espèces de mammifères. L'analyse comparative des gènes humain, murin, bovin et de rat met en évidence de

fortes similitudes dans l'organisation structurale de *ST6Gal I* et notamment au niveau de la région codante (Figure 31). Chez ces quatre espèces, le cadre ouvert de lecture se compose de 5 exons codants (E2 à E6), les points d'initiation et de terminaison de traduction étant respectivement situés dans les exons E2 et E6, ce dernier exon incluant également la totalité de la région 3' non traduite. Chez le rat, le gène s'étend sur plus de 80 kpb et se compose de 12 exons. *ST6Gal I* est un gène assez finement régulé et l'utilisation de différentes régions promotrices associée à des phénomènes d'épissage alternatif permet la transcription de 3 types majeurs d'ARNm (Paulson *et al.*, 1989). Le premier transcrit majoritaire est exprimé de façon ubiquitaire, il a une taille de 4,7 kb et se compose des exons E-1 à E6 (Figure 31). Le deuxième type de transcrit est uniquement exprimé par le foie, mesurant 4,3 kb il diffère du premier type de messenger par l'absence des exons E-1 et E0. Enfin, alors que ces deux premières familles d'ARNm permettent la synthèse d'une protéine fonctionnelle, il a été décrit dans les reins une troisième famille de transcrit de 3,7 kb qui a pour base structurale les exons E4 à E6 et dont la région 5' non traduite est formée par l'association d'un, deux ou trois exons spécifiques du rein (Wen *et al.*, 1992). Le point d'initiation de la traduction se situant dans l'exon 2, ces transcrits ne permettent pas la production de l'enzyme.

Chez l'homme, ce gène a été localisé sur le bras long (q21-28) du chromosome 3 et l'ensemble des transcrits identifiés jusqu'à aujourd'hui ont tous en commun la présence des exons E1 à E6. Concernant la région 5' non traduite des différents messagers, il a pu être mis en évidence en amont de l'exon 1, trois exons nommés X, Y et Z. Les exons Y et Z sont homologues aux exons E-1 et E0 du rat et leur association avec les exons 1 à 6 donne naissance à un transcrit qui a une expression ubiquiste. Par ailleurs, il existe aussi un transcrit de *ST6Gal I* spécifique au foie. Identifié dans un premier temps dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 (Aas-Eng *et al.*, 1995), il est constitué des exons E1 à E6 et il représente la forme majoritaire de transcrits au niveau hépatique. Le troisième type de messenger de *ST6Gal I* fréquemment retrouvé chez l'homme et qui résulte de l'association des exons X à 6 (Figure 31), n'a pas d'équivalent chez le rat et son expression est limitée aux lymphocytes B matures et aux cellules de lignées lymphoblastoïdes (Wang *et al.*, 1993). Enfin, dans certaines populations de cellules lymphoblastoïdes, ont été détectés quelques transcrits à expression minoritaire qui proviennent de l'utilisation de trois exons 5' non codants additionnels dénommés U, V et W (Lo et Lau, 1996).

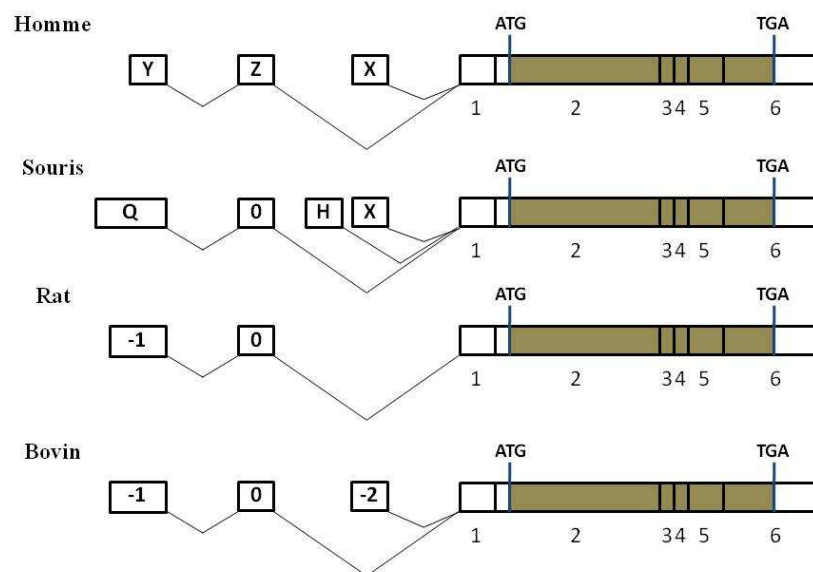


Figure 31 : Représentation schématique des transcrits majoritaires de *ST6Gal I* chez l'homme, la souris, le rat et le bovin (d'après Dall' Olio, 2000). Les différents ARNm sont obtenus par la jonction des différents exons 5' non codants à l'exon 1. Les exons homologues sont alignés verticalement les uns avec les autres. La région grisée représente le cadre de ouvert de lecture du gène.

Chez la souris, *ST6Gal I* se situe au niveau du chromosome 16 et les transcrits qui en sont issus, en plus de présenter la structure basique à 6 exons des messagers de ce gène, ressemblent beaucoup dans leurs régions 5' non codantes et dans leurs profils d'expression à ceux observés chez l'homme. Il y a en effet un transcrit à expression ubiquitaire qui présente une extrémité 5' non traduite provenant de l'association des exons Q et O (Figure 31), respectivement homologues des exons Y et Z humains. Il existe également un transcrit spécifiquement exprimé par les lymphocytes B dont la 5' UTR résulte de la jonction de l'exon X avec l'exon 1. La particularité de la souris vient du fait qu'il y a dans le gène plusieurs types d'exons X, que sont les exons X_{1a}, X_{1b}, X₂ et X₃, les transcrits de type X₁ ayant une durée de vie longue contrairement aux transcrits de types X₂ et X₃ qui disparaissent assez rapidement (Wuensch *et al.*, 2000). Enfin, il existe aussi un transcrit hépatique de *ST6Gal I* chez la souris mais dont la structure est différente de celle décrite chez le rat et l'homme. En effet, alors que dans ces deux dernières espèces le transcrit hépatique n'était constitué que des exons E1 à E6, la région 5' du transcrit murin possède un exon supplémentaire, l'exon H (Hu *et al.*, 1997), positionné sur le gène entre les exons X et O (Figure 31).

Chez le bovin, *ST6Gal I* se situe sur le chromosome 1 et trois catégories de transcrits ont été isolés (Mercier *et al.*, 1999). Du point de vue structural, le parallèle avec les différentes formes d'ARNm humains est évident. En effet, la première catégorie de transcrits est issue de la jonction des exons

E-1 et E0 avec l'exon E1, E-1 et E0 étant respectivement les homologues des exons humains Y et Z (Dall'Olio, 2000). De même, on observe également des ressemblances entre l'homme et le bovin pour la deuxième famille de transcrits (Figure 31). Enfin, le troisième transcrit bovin, uniquement composé des exons 1 à 6, a exactement la même structure que le transcrit hépatique humain. Cependant, bien que les structures des transcrits humains et bovins soient identiques, leurs profils de distribution tissulaire sont très différents (Mercier *et al.*, 1999). A titre d'exemple, citons le fait que le transcrit bovin homologue au transcrit hépatique humain présente un profil d'expression beaucoup moins restrictif puisqu'il est retrouvé dans des organes tels que le cœur, les reins ou encore la rate. Pourtant, les exons non traduits X et (-2), respectivement en 5' des exons 1 humain et bovin, présentent un taux d'identité élevé.

B. Structure et expression du gène *ST6Gal II*

Plus récemment découvert, la structure de ce gène n'a été décrite que chez l'homme (Takashima *et al.*, 2002 ; Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003) et la souris (Takashima *et al.*, 2003). De façon générale, la région codante du gène s'organise de la même manière que *ST6Gal I* à savoir en 5 exons (Figure 32), les points d'initiation et de terminaison de traduction étant respectivement situés dans les exons 1 et 5. Le gène humain est localisé sur le chromosome 2 (2q11.2-q12.1) sur lequel il s'étend sur plus de 85 kpb, et il se trouve sur le chromosome 17 murin où il s'étend sur 70 kpb.

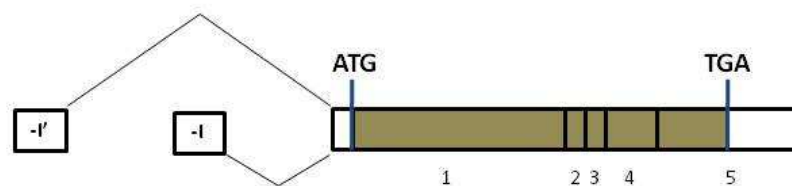


Figure 32 : Représentation schématique des transcrits connus de *hST6Gal II*. La région codante est représentée en gris, les exons 5' non traduits en blancs

Que ce soit pour l'une ou l'autre des espèces, *ST6Gal II* présente un profil d'expression tissulaire assez restreint. Il est principalement exprimé dans le cerveau et le colon humain et est présent dans

le cerveau et à certains stades embryonnaires chez la souris. Concernant les ARNm et dans l'état actuel des connaissances, un seul type de transcrit a été mis en évidence pour la souris (Takashima *et al.*, 2003) et une analyse des banques d'EST humaines a révélé qu'il existerait au moins deux types de transcrit (Figure 32) ne différant qu'au niveau de leurs régions 5'-UTR (Takashima *et al.*, 2002). Enfin, ces mêmes auteurs ont montré la présence d'un variant transcriptionnel plus court, dépourvu des séquences codant les sialylmotifs S, III et VS, dont la traduction conduit à la production d'une enzyme inactive et dont les fonctions biologiques restent à découvrir.

C. Comparaison des régions codantes des gènes *ST6Gal I* et *II*

Comme il l'a été mentionné au paragraphe précédent, le cadre ouvert de lecture de ces deux gènes est constitué de 5 exons avec un découpage très bien conservé. En effet, que ce soit chez l'homme ou la souris, à l'exception de l'exon 1 qui code pour la région tige, la taille des exons 2 à 5 est presque identique. De plus, à la manière des gènes *ST3Gal I* et *II*, les séquences codants les sialylmotifs L et S se retrouvent à cheval sur deux exons différents, les exons codants 1 et 2 pour le sialylmotif L et 4 et 5 pour le sialylmotif S (Figure 33).



Figure 33 : Représentation des structures génomiques des *ST6Gal* chez la souris (d'après Takashima, 2008). Les cadres grisés représentent les régions codantes alors que les exons non traduits sont représentés en blanc. Les chiffres précisent le nombre d'acides aminés codés par chacun des exons et les rectangles noirs indiquent les positions relatives des différents sialylmotifs (de gauche à droite, sialylmotifs L, S, III et VS). Entre parenthèses et en dessous du nom de chaque gène sont indiqués les substrats préférentiels de chacune des enzymes.

2.2.2. Fonctions physiologiques associées au motif Sialyl- α 2,6-lactosamine

2.2.2.1. La clairance des glycoprotéines sériques

Comme toutes protéines, les glycoprotéines sériques ont une durée de vie limitée et doivent être éliminées à un moment ou à un autre, leur dégradation étant réalisée par le foie. La captation de ces

glycoprotéines circulantes est en partie due à un récepteur à asialoglycoprotéines, l'ASGP-R, localisé à la surface hépatocytaire et qui reconnaît spécifiquement les glycanes se terminant par un galactose ou une N-acétylgalactosamine (Park *et al.*, 2003). De ce fait, toute protéine porteuse de l'épitope Sia₆LacNAc ne sera pas reconnue par l'ASGP-R et poursuivra sa course dans la circulation sanguine (Figure 34). Mais compte tenu des conditions environnementales présentes dans le sang, l'acide sialique du Sia₆LacNAc finira par être éliminé. Ce clivage laisse alors apparaître en position terminale du glycanne un galactose, rapidement reconnu par l'ASGP-R (Figure 34). Enfin, le complexe protéine-récepteur est internalisé puis la protéine dégradée.

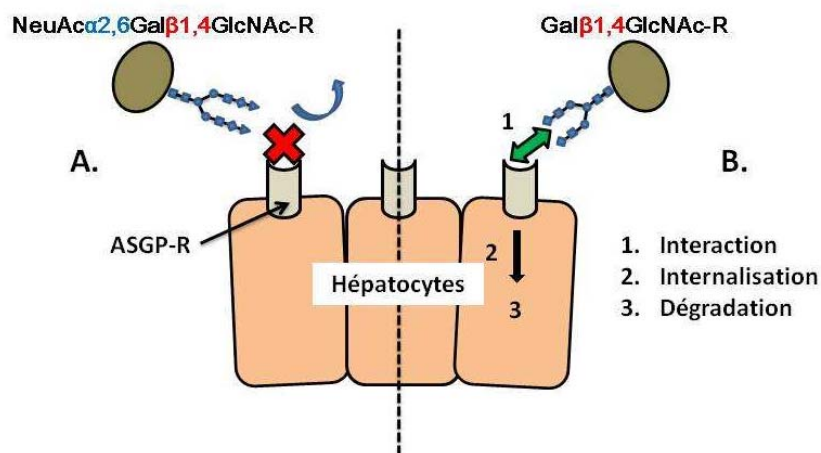


Figure 34 : La voie de dégradation des glycoprotéines sériques par les cellules hépatiques. (A), lorsque la protéine porte un glycanne sialylé, elle n'interagit pas avec le récepteur à asialoglycoprotéines (ASGP-R) et poursuit sa route dans la circulation sanguine. (B), la perte de l'acide sialique laisse apparaître un Gal qui favorise l'interaction glycanne récepteur (1). Ce complexe est ensuite internalisé (2) puis dégradé par la cellule hépatique.

2.2.2.2. Sia₆LacNAc et cancer

La Sialyl- α 2,6-lactosamine joue également un rôle au cours du développement tumoral. Il a été montré dans différents types de cancers, incluant le cancer du colon (Dall'Olio *et al.*, 1992), du sein (Recchi *et al.*, 1998) et du col de l'utérus (Wang *et al.*, 2001), qu'il y a une augmentation de la transcription de *ST6Gal I*. La corrélation quantitative entre la surexpression du gène et l'augmentation de motifs α 2,6-sialylés à la surface cellulaire n'est pas stricte mais, dans la plupart des cas, un taux de transcrits élevé de *ST6Gal I* associé à une forte réactivité de la SNA (lectine qui reconnaît les structures α 2,6-sialylées) sont considérés comme de « bons » indicateurs de mauvais pronostic vital.

L'apparition du motif Sia₆LacNAc est en général corrélée au pouvoir métastatique de la tumeur. En effet, de nombreuses protéines intervenant dans les interactions cellulaires, telles que l'intégrine β1, la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, sont connues pour être des substrats de ST6Gal I. Ainsi, toute modification du niveau d'expression de la sialyltransférase peut entraîner des changements de la glycosylation de ces protéines d'adhésion et de fait modifier les interactions qu'elles forment. A titre d'exemple, il a été montré sur des colonocytes transfectés avec ST6Gal I que ces cellules présentent une hypersialylation de l'intégrine β1. Cette hypersialylation augmente l'adhérence des colonocytes au collagène I et à la laminine ce qui a pour conséquence de favoriser la motilité cellulaire (Seales *et al.*, 2005). Les mêmes conclusions ont pu être établies sur des cellules cancéreuses ovariennes qui ont présenté un potentiel métastatique très élevé (Hedlund *et al.*, 2008). Enfin, un niveau élevé de transcription de *ST6Gal I* dans des cellules cancéreuses mammaires a pu être associé à une diminution des interactions cellule-cellule et à une augmentation de l'adhérence au collagène IV (Lin *et al.*, 2002), ces deux facteurs favorisant très fortement la formation de métastases.

2.2.2.3. Sia₆LacNAc, le ligand du CD22

Le CD22 est un récepteur appartenant à la famille des Siglecs qui reconnaît spécifiquement les motifs Sia₆LacNAc des glycoprotéines. Localisé à la surface des lymphocytes B matures, ce récepteur est un régulateur négatif de la voie de signalisation du BCR (B Cell Receptor). Le mécanisme de régulation négative du BCR par le CD22 n'est pas encore totalement élucidé mais il apparaît clairement que l'interaction en *cis* du CD22 avec les *N*-glycannes du BCR (Figure 35) est indispensable à ce processus d'atténuation. Dans l'état actuel des connaissances, il semble que la liaison CD22-BCR induit le recrutement de toute une série de partenaires, tel que la tyrosine phosphatase SHP-1 (Jin *et al.*, 2002), qui par leurs actions permettent de limiter la stimulation du BCR par les éléments du milieu extérieur. Cette régulation s'avère nécessaire puisque l'analyse de lymphocytes de souris KO pour CD22 a montré qu'ils ont d'une part une plus forte susceptibilité à entrer en apoptose (Otipoby *et al.*, 1996) et d'autre part une grande propension à produire des anticorps auto-immuns de forte affinité (O'Keefe *et al.*, 1999).

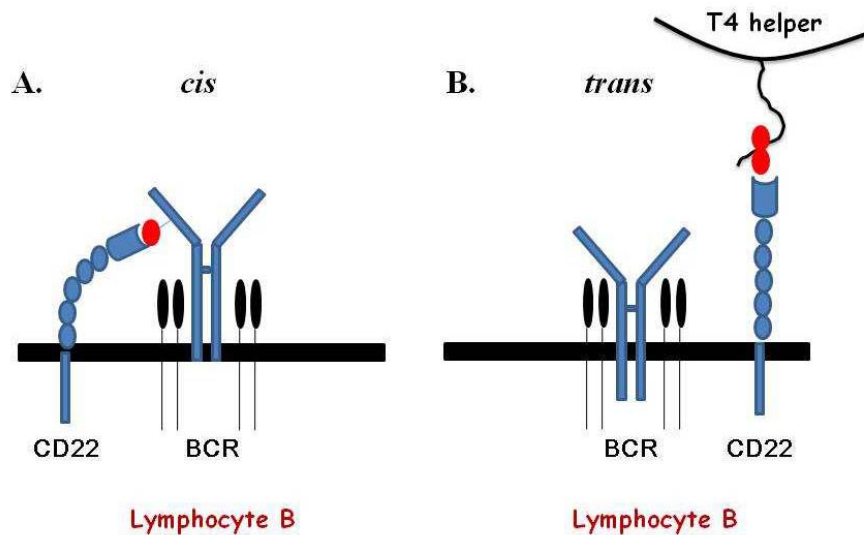


Figure 35 : Les interactions de CD22 avec ces différents ligands. En A, interaction de CD22 avec le BCR (B-Cell Receptor), elle est dite en « cis » car elle s'effectue entre deux protéines appartenant à la même cellule. La liaison ligand récepteur permet le recrutement de différents partenaires qui vont réguler le BCR. En B, représentation schématique de l'interaction de CD22 avec un ligand localisé sur une autre cellule (ici un lymphocyte T4 helper), cette interaction, dite en « trans », permet par exemple l'adhésion cellulaire. Les ronds rouges représentent les motifs $Sia_6LacNAc$ des N-glycannes.

CD22 n'a pas comme unique fonction celle de moduler la voie de signalisation du lymphocyte B. Compte tenu du fait que son ligand est l'une des structures glycaniques des plus présentes sur le N-glycannes, elle va former de nombreux autres types d'interactions. Elle a notamment été décrite comme une molécule d'adhésion cellulaire qui favorise les communications cellule-cellule avec d'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T (Figure 35) ou les monocytes (Engel *et al.*, 1993, Collins *et al.*, 2004). Lors du processus inflammatoire, le niveau d'expression de structures $Sia_6LacNAc$ peut fortement augmenté à la surface des cellules endothéliales. L'apparition de ces structures favoriserait l'adressage du lymphocyte B au site inflammatoire par une interaction en *trans* du CD22 (Hanasaki *et al.*, 1994).

2.2.2.4. $Sia_6LacNAc$ et réponse inflammatoire

Comme il l'a été très brièvement introduit au paragraphe précédent, les niveaux d'expression de la sialyl- $\alpha 2,6$ -lactosamine et de ST6Gal I peuvent être modifiés dans certaines conditions au cours de la réponse inflammatoire. En effet, plusieurs études montrent chez le rat (Kaplan *et al.*, 1983) et la souris (Dalziel *et al.*, 1999 ; Appenheimer *et al.*, 2003) qu'il y a une augmentation dans le foie de la transcription et de la traduction de ST6Gal I au cours de la phase aigue de l'inflammation. De plus,

ils observent que les cellules hépatiques secrètent ST6Gal I sous une forme tronquée de ses régions cytosoliques et transmembranaires ce qui en fait une protéine de la phase aigüe de l'inflammation (Jamieson *et al.*, 1993). Chez la souris, il a particulièrement été montré que cette surexpression de *ST6Gal I* est sous la dépendance du promoteur P1 (Appenheimer *et al.*, 2003) qui conduit à la synthèse majoritaire du transcrit hépatique (Dalziel *et al.*, 1999).

Plusieurs hypothèses quant aux rôles de cette structure au cours de la réponse inflammatoire ont été avancées. L'une d'entre elle vient du fait qu'une majorité de pathogènes préfère la Sialyl- α 2,3-lactosamine à la Sialyl- α 2,6-lactosamine comme structure réceptrice (Karlsson, 1995 ; Angata et Varki, 2002). Ainsi, l'activation de la transcription de *ST6Gal I* et la production de la sialyltransférase qu'il code permet en entrant en compétition avec les ST3Gal de limiter le nombre de motifs Sia₃LacNAc exposés à la surface cellulaire. Cette diminution de l'exposition du Sia₃LacNAc au profit du Sia₆LacNAc a pour but de réduire le nombre d'interactions du pathogène avec la cellule et donc de minimiser la propagation de l'infection (Gagneux et Varki, 1999 ; Gagneux *et al.*, 2003). Cette hypothèse est soutenue par le fait que le taux de transcription de *ST6Gal I* revient rapidement à un niveau basal après le stimulus inflammatoire afin d'éviter tout phénomène rapide d'adaptation des pathogènes à ce mécanisme de défense « passif ».

3. L'antigène Sialyl-Lewis^X : un antigène tissulaire essentiel pour l'adhésion cellulaire

La famille des structures glycaniques fucosylées, à laquelle appartient l'antigène Sialyl-Lewis^X, est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement tissulaire, l'angiogenèse, la fécondation ou encore l'inflammation et l'adhésion cellulaire. Tout comme les acides sialiques, le fucose est un monosaccharide généralement retrouvé en périphérie des chaînes glycaniques ce qui lui donne une position privilégiée pour interagir avec les molécules du milieu extérieur. Le greffage du fucose est réalisé par une famille de glycosyltransférases, les fucosyltransférases, répertoriées dans les familles CAZy 10, 11, 23, 65 et 68

3.1. Les fucosyltransférases

Cette famille de glycosyltransférases est, à l'instar des sialyltransférases, divisée en plusieurs sous familles sur la base de la spécificité de substrat et de la liaison formée : les α 1,2, les α 1,3/4, les α 1,6 et les *O*-fucosyltransférases.

Les *O*-fucosyltransférases sont des glycoprotéines solubles retrouvées dans le RE où elles initient la formation des *O*-fucosylglycannes (Luo et Haltiwanger, 2005) que nous avons précédemment décrits au paragraphe 1.1.4. Chez les eucaryotes, les α 1,2, α 1,3/4 et α 1,6 fucosyltransférases sont des glycoprotéines transmembranaires de type II localisées dans l'appareil de Golgi et constituées d'un court domaine N-terminal cytosolique, d'un seul domaine transmembranaire, prolongé dans la lumière golgienne par une région tige et un domaine C-terminal catalytique (Nilsson *et al.*, 1993). Chez les mammifères, les α 1,2-fucosyltransférases ont la capacité de transférer un fucose sur le groupement hydroxyle porté du carbone 2 d'un galactose porté par une chaîne terminale de lactosamine et ce tout autant sur les *O*- que sur les *N*-glycannes (Figure 36). A l'autre extrémité du *N*-glycanne, les α 1,6-fucosyltransférases greffent le fucose sur l'hydroxyle en 6 de la première *N*-acétylglucosamine du chitobiose. Enfin la famille la plus diversifiée est celle des α 1,3/4-fucosyltransférases qui ont en commun la capacité de fucosyler les *N*-acétylglucosamines des

chaînes polylactosaminiques des *N*- et des *O*-glycannes. Bien qu'elles soient toutes capables d'ajouter un fucose sur n'importe quelle LacNAc du glycanne, elles ont chacune leurs préférences. C'est ainsi que, chez l'homme, une enzyme comme FUT5 a une affinité plus prononcée sur les maillons internes, que FUT3, FUT4 ou encore FUT6 fucosylent préférentiellement les GlcNAc situées au milieu des antennes glycaniques et que FUT7 a tendance à transférer le fucose sur les chaînes lactosaminiques terminales (Figure 36). Enfin, le substrat préférentiel d'une fucosyltransférase comme FUT9 change en fonction de l'état de sialylation (Figure 36) alors que FUT7 est incapable de toute activité fucosyltransférase lorsque le glycanne n'est pas sialylé.

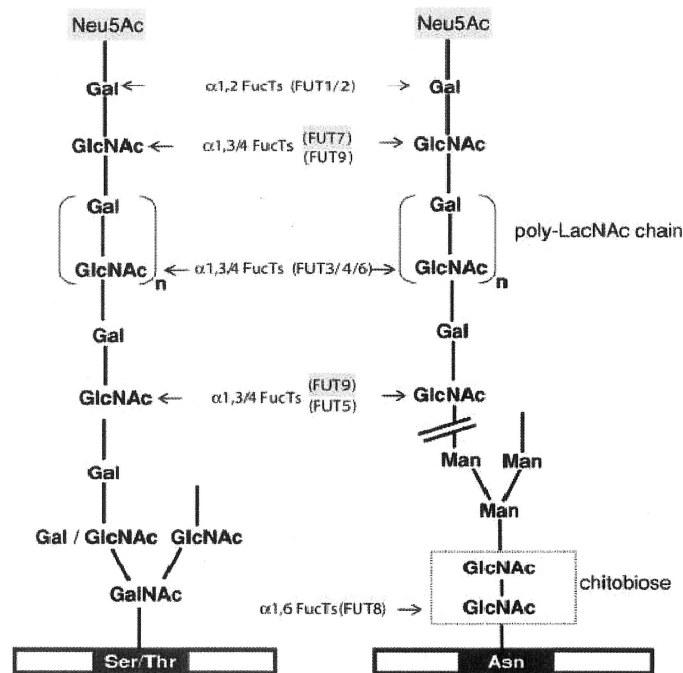


Figure 36 : Les sites de fucosylation des $\alpha 1,2$, $\alpha 1,3/4$ et $\alpha 1,6$ -fucosyltransférases chez l'homme (d'après Ma *et al.*, 2006). Sont représentés les 2 principaux types de structures acceptrices contenant des chaînes polylactosaminiques, les *O*-glycannes à gauche et les *N*-glycannes à droite, ces derniers étant les seuls à posséder le chitobiose. En ce qui concerne les $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransférases, seuls les sites principaux de fucosylation ont été indiqués. Lorsque le nom de l'enzyme est grisé, la présence de l'acide sialique en bout de chaîne est nécessaire pour l'addition d'un fucose.

Toutes ces enzymes utilisent un substrat donneur commun, le GDP- β -Fucose, et ont la capacité de transférer le fucose sur les glycannes des glycoconjugués selon la réaction présentée ci-dessous. Les fucosyltransférases induisent toutes une inversion de l'anométrie, le fucose lié au GDP par une liaison β est donc systématiquement transféré sur la structure acceptrice en anomérie α .



3.1.1. Le GDP-Fucose

Ces différentes fucosyltransférases utilisent un substrat donneur unique, le GDP-Fucose, qui doit être retrouvé en concentration suffisante pour que la fucosylation puisse s'effectuer dans les meilleures conditions. Ce glycosyl-nucléotide peut être obtenu par 2 voies de biosynthèse distinctes ayant lieu dans le cytoplasme (Becker et Lowe, 2003), la voie *de novo* et la voie dite de « sauvetage » ou de « récupération » (Figure 37). La voie *de novo* compte pour environ 90% du pool de GDP-Fucose de la cellule et utilise le glucose et le mannose fournis par l'alimentation. A partir du glucose, la première étape consiste à épimériser cet ose en mannose, ce dernier étant ensuite utilisé pour former du GDP-Mannose. La suite de la voie de biosynthèse est réalisée par deux enzymes, la GDP-Mannose 4,6 déhydratase (GMD) et la GDP-keto-6-déoxymannose 3,5-épimérase/4-réductase (FX), qui vont successivement permettre la conversion du GDP-Mannose en GDP-Fucose. En effet, le GDP-Mannose est d'abord pris en charge par la GMD qui le transforme en GDP-4-keto-6-déoxy-mannose (Figure 37), substrat de l'enzyme FX. Cette enzyme est un homodimère qui a la double activité catalytique 4-réductase/3,5-épimérase (Tonetti *et al.*, 1996) qui sont respectivement les deux dernières étapes nécessaires à l'obtention du GDP-Fucose.

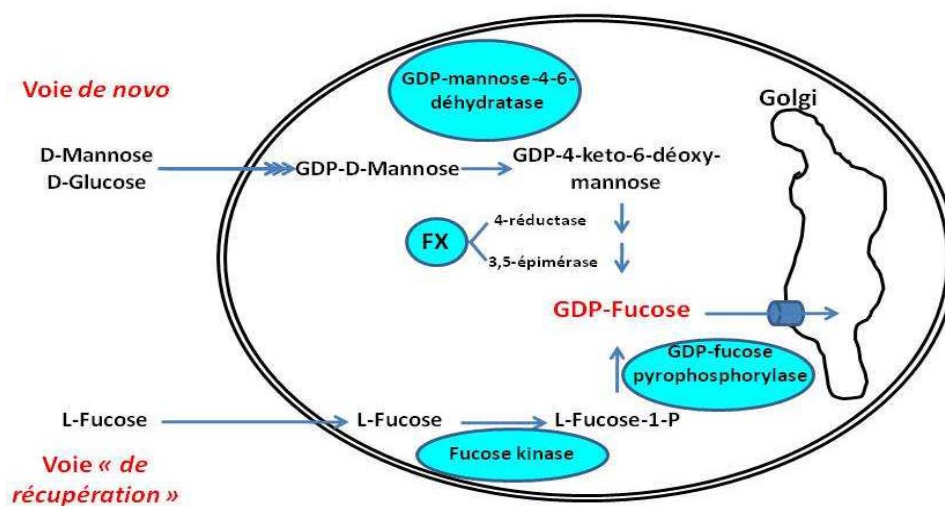


Figure 37 : Les voies de biosynthèse du GDP-Fucose (d'après Marquardt *et al.*, 1999). La cellule utilise deux voies différentes pour synthétiser le GDP-Fucose, la voie *de novo* et la voie de « récupération ». Les enzymes impliquées au niveau de chaque étape importante sont indiquées dans les cercles turquoise, le transporteur, Gft, permettant le passage du GDP-L-Fucose du cytoplasme vers les vésicules golgiennes est représenté par le cylindre bleu.

L'autre voie de biosynthèse du GDP-Fuc passe par l'utilisation du fucose cytosolique libre. Ce fucose a deux origines possibles que sont la source extracellulaire et la dégradation lysosomale des glycoprotéines (Becker et Lowe, 2003). L'activation de ce monosaccharide sous forme de glycosyl-

nucléotide s'effectue en 2 étapes : le fucose est dans un premier temps utilisé par la fucose kinase qui le transforme en fucose-1-P (Figure 37), ce dernier étant ensuite converti en GDP-Fuc par l'action de la GDP-fucose pyrophosphorylase (Niittymaki *et al.*, 2004).

Qu'il soit issu de l'une ou de l'autre des voies de synthèse, le GDP-Fucose est acheminé via la protéine Gft dans l'appareil de Golgi où il sera utilisé par les fucosyltransférases (Luhn *et al.*, 2004). Gft est un transporteur de GDP-Fuc retrouvé sous la forme d'un homodimère solidement ancré dans la membrane golgienne par 10 segments transmembranaires (Hirschberg, 2001). Les *O*-fucosyltransférases, qui ont une localisation réticulaire, utilisent aussi ce substrat donneur mais dans l'état actuel des connaissances, aucun transporteur de GDP-Fuc n'a pu être identifié au niveau du RE.

3.1.2. Les α 1,6-fucosyltransférases

Chez les mammifères, l' α 1,6-fucosylation est particulièrement répandue et peut être considérée comme ubiquitaire tant le nombre de glycoprotéines portant ce type de modification est important (Miyoshi *et al.*, 1999). Cette glycosylation, qui consiste au greffage du fucose sur le carbone 6 de la GlcNAc proximale du groupement chitobiose des *N*-glycannes (Figure 36), est réalisée par une seule enzyme codée par le gène *FUT8* qui est localisée dans les citernes transgolgiennes et nécessite la présence de Mg^{2+} pour fonctionner. Elle ne peut agir que si la GlcNAc liée en β 1,2 sur le Man du bras α 1,3 du noyau du *N*-glycane (Figure 38) n'est pas substituée (Uozumi *et al.*, 1996).

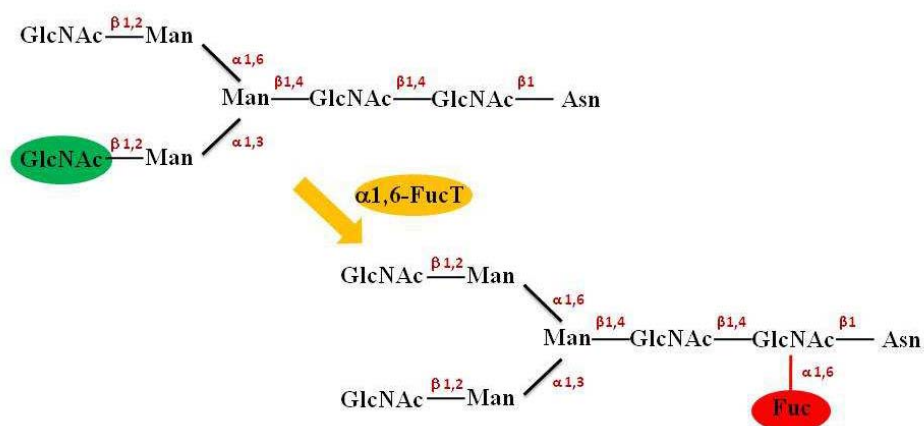


Figure 38 : Réaction enzymatique catalysée par l' α 1,6-Fucosyltransférase. Pour se fixer au *N*-glycane, la fucosyltransférase a besoin que la GlcNAc entourée en vert ne soit pas substituée. Elle transfère alors le fucose sur la GlcNAc directement liée sur l'Asparagine (Asn).

3.1.2.1. Organisation protéique

En ce qui concerne la structure de cette protéine, elle se démarque des autres fucosyltransférases par sa grande taille qui est de 575 acides aminés, et ce que ce soit chez l'homme, la souris, le porc ou encore le bovin. C'est une enzyme particulièrement bien conservée au cours de l'évolution. A titre d'exemple, l'enzyme bovine possède respectivement 97%, 96% et 95% d'identité avec ses homologues humaine, murine et porcine (Javaud *et al.*, 2000). L' α 1,6-fucosyltransférase a toutes les caractéristiques d'une protéine transmembranaire de type II (Figure 39). Elle renferme trois motifs particulièrement bien conservés entre les différentes espèces, ceux-ci étant également retrouvés chez les α 1,2-fucosyltransférases (Oriol *et al.*, 1999^b, Martinez-Duncker *et al.*, 2003). La protéine humaine contient 8 cystéines qui permettent la formation de 4 ponts disulfures, ces derniers étant importants pour la stabilité de l'enzyme plus que pour le mécanisme catalytique (Figure 39). Enfin, il existe au niveau de l'extrémité C-terminale un domaine SH3 très similaire à ceux trouvés sur d'autres protéines mais unique chez les glycosyltransférases (Figure 39). Il pourrait permettre l'association avec certains substrats ou encore se lier à une protéine de régulation restant inconnue aujourd'hui (Ihara *et al.*, 2007).

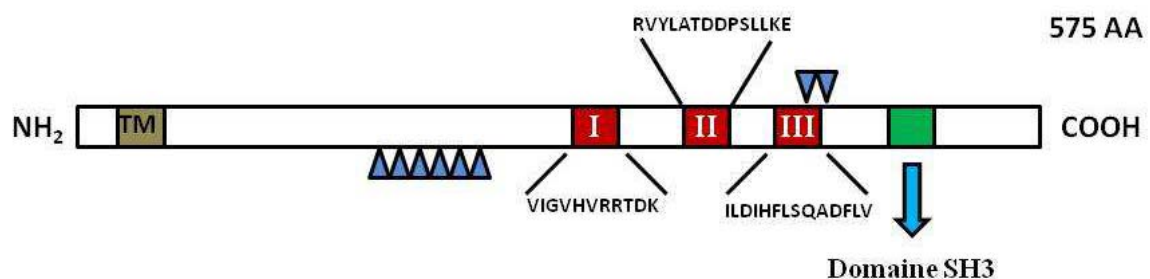


Figure 39 : Représentation schématique de la structure de l' α 1,6-Fucosyltransférase. TM = *domaine transmembranaire de l'enzyme*. Les rectangles rouges I, II et III constituent les motifs spécifiques retrouvés dans toutes les α 1,2 et les α 1,6 fucosyltransférases. Les séquences des 3 motifs sont précisées. Les triangles bleus indiquent la localisation des cystéines conservées. En vert est représenté le domaine Src homology domain spécifique à cette enzyme.

3.1.2.2. Structure du gène *FUT8*

Du point de vue génomique, ce gène est une exception au sein des gènes de la famille des fucosyltransférases. En effet, alors que pour la majorité des gènes de fucosyltransférases la structure de la région codante est monoexonique, l'ORF de *FUT8* est particulièrement morcelée. Sa structure

a pu être établie chez l'homme où il a été localisé sur le chromosome 14 en q23.2-24.1 (Couillin *et al.*, 2002) et sur lequel il s'étend sur près de 50 kpb. Son cadre de lecture se compose de 9 exons chez l'homme (Yanagidani *et al.*, 1997), une structure qui apparaît plus morcelée que celle du gène bovin pour lequel il n'a été décrit que 5 exons codants (Javaud *et al.*, 2000). Une comparaison plus fine de ces 2 gènes permet cependant de se rendre compte que la plus grande différence réside dans le découpage des exons 1 et 2 bovins, ces derniers regroupant les séquences des exons D à I humains (Figure 40).

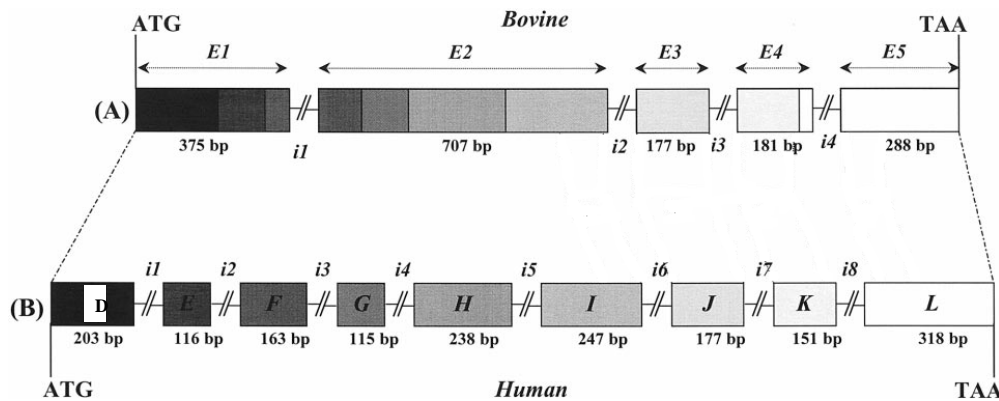


Figure 40 : Comparaison de la répartition exon/intron des gènes *FUT8* (A) bovin et (B) humain (d'après Javaud *et al.*, 2000). Les tailles de chaque intron sont indiquées en paires de bases (bp). Les séquences homologues entre les deux gènes sont représentées par des couleurs identiques.

3.1.2.3. Rôles associés à l' α 1,6-fucosylation

La présence de ce fucose proximal participe au maintien de l'intégrité du *N*-glycane (Stubbs *et al.*, 1996). Sa position particulière diminue la flexibilité du glycane qui devient alors moins accessible aux glycosidases. Par ailleurs, cet α 1,6-fucose peut avoir une importance capitale sur la structure finale des chaînes glycaniques, l'exemple le plus intéressant étant celui de la polysialylation de la NCAM (Kojima *et al.*, 1996) dont la fonction est modulée par la présence ou l'absence de ces longues chaînes d'acides sialiques (PSA). La formation des PSA dépend de l'action de ST8Sia II mais celle-ci ne peut agir que si la NCAM possède sur ces glycanes un fucose α 1,6-lié, son absence empêchant la bonne fixation de la sialyltransférase et de fait la polysialylation. Outre ce rôle structural, il a pu être établi que ce fucose proximal a une importance fonctionnelle. Une étude menée sur des fibroblastes embryonnaires de souris a par exemple montré que l'absence d' α 1,6-fucosylation des intégrines $\alpha_3\beta_1$, récepteur majeur de la laminine 5, est associée à une forte réduction de la migration cellulaire (Zhao *et al.*, 2006). Enfin, *FUT8* et son produit peuvent être de bons marqueurs de la progression tumorale. En effet, dans certains carcinomes de la thyroïde, la

surexpression de *FUT8* est directement reliée à la taille de la tumeur et à la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques (Ito *et al.*, 2003).

3.1.3. Les α 1,2-fucosyltransférases

Ces enzymes, répertoriées dans la famille 11 de la banque de données CAZy, facilitent le transfert en α 1,2 du fucose sur le galactose de maillons disaccharidiques de type I, II ou III, ces différents maillons étant retrouvés en position terminale des antennes des *O*- et des *N*-glycannes. Les structures α 2-fucosylées ont initialement été mises en évidence à la surface des globules rouges et déterminent les antigènes du système de groupes sanguins ABH (O). En effet, le disaccharide $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1\text{-R}$, qui détermine l'antigène H (ou O), est à la fois le substrat accepteur d'une α 3-N-acétylgalactosaminyltransférase et d'une α 1,3-galactosyltransférase qui assurent respectivement la formation des antigènes A et B (Figure 41). Ces épitopes glucidiques ne se retrouvent pas uniquement sur les cellules sanguines puisqu'ils sont également détectés au niveau de cellules endothéliales vasculaires, et, chez certaines personnes, à la surface de cellules épithéliales et dans la salive. Chez le bovin, les structures α 2-fucosylées sont également particulièrement abondantes dans les mucines et les glandes sous-maxillaires puisqu'elles représentent jusqu'à 12 % des oses totaux (Martensson *et al.*, 1998).

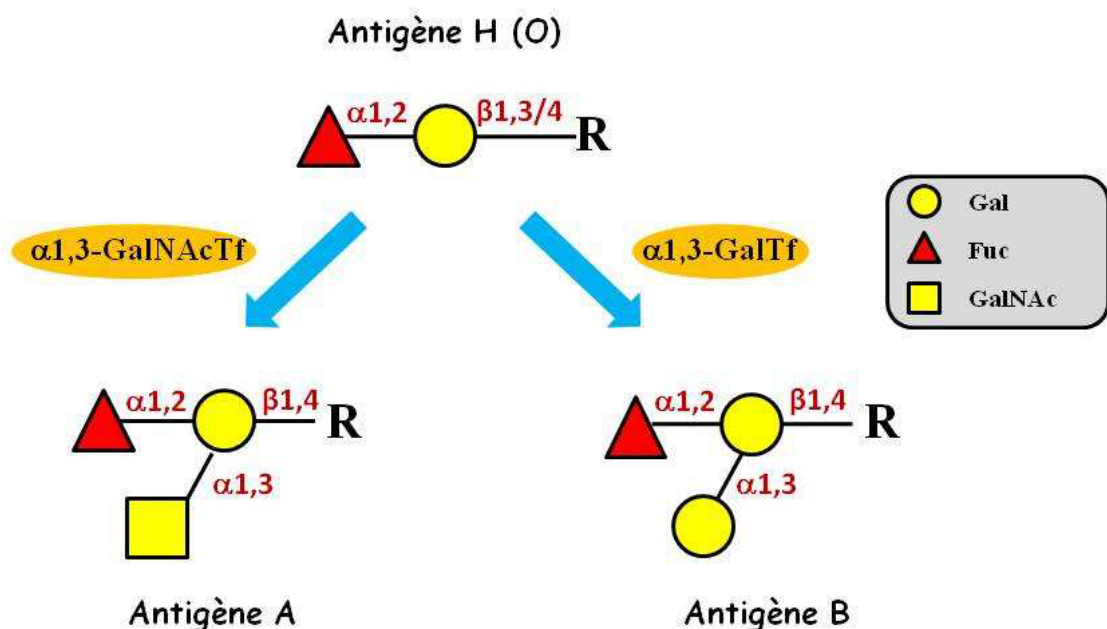


Figure 41 : Les antigènes de groupes sanguins du système ABH (O) retrouvés sur les *O*- et les *N*-glycannes. L'antigène H est le précurseur des antigènes A et B. R représente le second monosaccharide dont la nature est une GlcNAc pour les chaînes de types I et II ou une GalNAc pour les chaînes de type III. Les liaisons entre les différents oses sont indiquées en rouge foncé.

3.1.3.1. Les gènes *FUT1*, *FUT2*, *Sec1*

Le clonage des gènes des α 2-fucosyltransférases a été réalisé dans de nombreuses espèces de mammifères incluant l'homme (Larsen *et al.*, 1990 ; Kelly *et al.*, 1995 ; Rouquier *et al.*, 1995), la souris (Domino *et al.*, 2001), le bovin (Barraud *et al.*, 2000), et, quelque soit l'espèce, l'ORF de *FUT1*, *FUT2* et *Sec1* est toujours monoexonique. Cependant, *Sec1*, apparenté au gène *FUT2*, est considéré comme un pseudogène chez l'homme. En effet, bien que le gène soit transcrit, la protéine qu'il code est inactive du fait de deux délétions successives adjacentes qui entraînent un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon STOP (Rouquier *et al.*, 1995). Plusieurs études ont été menées pour déterminer la localisation chromosomique de *FUT1*, *FUT2* et *Sec1*. Ces trois gènes ont la particularité de présenter une organisation en cluster qui s'avère particulièrement bien conservée chez les mammifères (Apoil *et al.*, 2000). Ce cluster de gènes d' α 2-fucosyltransférases a été positionné sur le chromosome 19q13.3 chez l'homme (Reguigne-Arnould *et al.*, 1995), sur le chromosome 7 de la souris (Domino *et al.*, 2001) et sur le chromosome 18 chez le bovin (Saunier *et al.*, 2002), et, pour ces trois espèces, il s'étend sur une distance d'environ 100 kpb.

FUT1 et *FUT2* sont des gènes qui présentent un taux de polymorphisme élevé dont le catalogue ne cesse de s'agrandir (Storry *et al.*, 2006 ; Soejima *et al.*, 2005). Les diverses mutations identifiées sont en général associées à un dysfonctionnement ou à une inactivation des enzymes dont le résultat est l'apparition de nouveaux phénotypes : phénotypes Bombay (*FUT1* et 2 mutés), para-Bombay (*FUT1* muté, *FUT2* normal) ou encore non-sécréteur (*FUT2* muté). Il a été suggéré que les différents allèles de *FUT2* pourraient être utilisés comme marqueurs anthropologiques (Koda *et al.*, 2003). Il semble en effet que la distribution des allèles conduisant au phénotype non-sécréteur est assez spécifique de chaque groupe ethnique, et nous pouvons par exemple citer le cas de la substitution 428 G>A modifiant le trp 143 en un codon STOP (Kelly *et al.*, 1995) qui est la mutation la plus fréquemment représentée au sein de la population européenne.

3.1.3.2. Les fucosyltransférases *H* et *Sécréteur*

Les α 1,2-fucosyltransférases ont toutes une structure de glycoprotéine transmembranaire de type II et contiennent dans leur domaine catalytique trois régions conservées qui semblent être impliquées

dans le mécanisme réactionnel de ces enzymes (Oriol *et al.*, 1999^b ; Martinez-Dunker *et al.*, 2003). Cependant, seul le motif III leur est spécifique compte tenu du fait que les séquences des motifs I et II sont également présentes chez les $\alpha 6$ -fucosyltransférases. Il a par ailleurs été démontré que la fixation du GDP-Fuc au site catalytique des enzymes nécessite la présence de deux arginines dans le premier motif (Takahashi *et al.*, 2000). Chez l'homme, l'enzyme H codée par *FUT1* est principalement détectée dans les érythrocytes et les endothéliums vasculaires (Mollicone *et al.*, 1996) alors que l'enzyme de type « Sécréteur », codée par *FUT2*, se trouve au niveau des épithéliums et des fluides biologiques, c'est-à-dire la salive (Avent *et al.*, 1997). Ces différences de profil d'expression expliquent pourquoi les individus non sécréteurs ne produisent pas dans leurs tissus exocrines l'antigène H et ses dérivés. En plus de ces différences de profil d'expression, les $\alpha 1,2$ -FucT H et Sécréteur présentent des différences dans leurs spécificités de substrats, la première préférant les accepteurs de type I et II aux accepteurs de type III, la seconde ayant une activité marquée sur les oligosaccharides de type I et III et une faible activité de transfert sur les glycanes de type II (Kyprianou *et al.*, 1990; Sarnesto *et al.*, 1990).

3.1.3.3. Fonctions associées à l' $\alpha 1,2$ -fucosylation

Les fonctions réalisées par ces antigènes de groupes sanguins sont encore assez mal connues. Par analyse comparative entre populations d'individus sécréteurs et non sécréteurs, il a tout de même pu être établi qu'il y avait une corrélation entre l' $\alpha 2$ -fucosylation et la susceptibilité à développer certaines pathologies. Cependant des résultats opposés ont été mis en évidence. Il a ainsi pu être montré que l'absence d' $\alpha 2$ -fucosylation est un facteur favorisant le développement de l'asthme (Ronchetti *et al.*, 2001) alors que cette même absence réduit les risques d'infection et de progression de virus comme HIV (Kindberg *et al.*, 2006). D'autre part, l' $\alpha 2$ -fucosylation peut avoir des conséquences indirectes. En effet, les $\alpha 2$ -fucosyltransférases, en entrant en compétition avec certaines $\alpha 3/4$ -fucosyltransférases, peuvent inhiber la formation de certains antigènes tissulaires de type Lewis comme le Sialyl-lewis^X (Mathieu *et al.*, 2004) dont l'absence pourra avoir une incidence physiologique.

3.1.4. Les $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransférases

Ce dernier groupe de fucosyltransférases golgiennes se constitue de 8 enzymes, FucTIII à VII et FucTIX à XI, et ont été classées dans la famille 10 de la banque de données CAZy. La présence de

ces glycosyltransférases ajoute un degré de complexité supplémentaire à la diversité structurale des antigènes glucidiques puisque, en agissant de concert avec les α 1,2-fucosyltransférases et certaines α 2,3-sialyltransférases, elles interviennent dans les dernières étapes de la biosynthèse des antigènes tissulaires de type Lewis. Les différentes étapes de sialylation et de fucosylation nécessaires à la formation de ces épitopes s'effectuent toujours dans un ordre bien précis (Figure 42). Chez les mammifères, une structure α 2-fucosylée ne pourra pas être α 2,3-sialylée et vice versa. Par ailleurs, l' α 1,2-fucosylation est réalisée avant l' α 3/4-fucosylation (Henry *et al.*, 1995) lors de la synthèse des antigènes difucosylés (Le^b , Le^y).

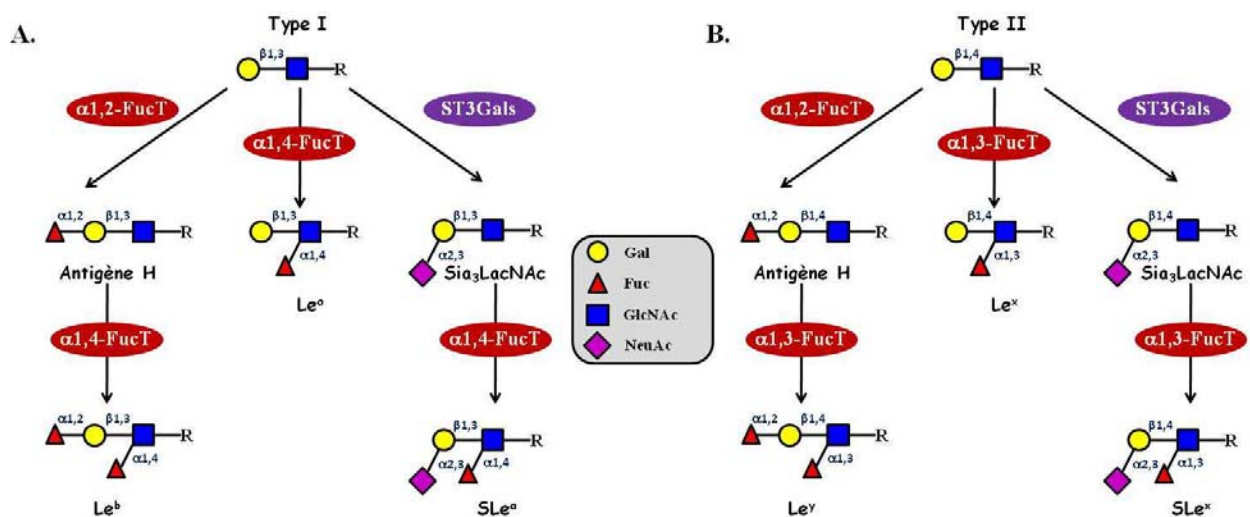


Figure 42 : Biosynthèse des antigènes tissulaires de type Lewis. Ces antigènes glucidiques sont synthétisés à partir de disaccharides de type I (A) ou de type II (B). La biosynthèse des antigènes Le^a , Le^b et SLe^a à partir d'oligosaccharides de type I requiert l'utilisation d' α 1,4-fucosyltransférases, celles des antigènes Le^x , Le^y et SLe^x des α 1,3-fucosyltransférases. La fucosylation et la sialylation s'effectuent dans un ordre bien précis : les α 1,2-fucosyltransférases et les α 2,3-sialyltransférases entrent en compétition pour le substrat accepteur, l'action des unes empêchant les autres d'agir ; les α 1,3/4-fucosyltransférases agissent en dernier, la présence d'un fucose lié en α 1,3 ou en α 1,4 inhibant le transfert de tout autre monosaccharide.

3.1.4.1. Les bases moléculaires du transfert du fucose en α 1,3 et α 1,4

Comme toutes les fucosyltransférases golgiennes, toutes ces enzymes sont des glycoprotéines transmembranaires de type II. Elles présentent dans leurs domaines catalytiques 5 motifs intervenant dans le mécanisme réactionnel (Figure 43). Les motifs C-terminaux IV et V ont été les premiers à être identifiés (Oriol *et al.*, 1999^b) et sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation

du GDP-Fucose (de Vries *et al.*, 2001), les motifs I à III jouant un rôle dans la reconnaissance des différents substrats accepteurs. Plus particulièrement, le motif II est déterminant vis-à-vis de la spécificité de la liaison formée par ces fucosyltransférases. En effet, alors que toutes ces enzymes ont la capacité de transférer un fucose en α 1,3, seules FUT3 et FUT5 peuvent catalyser la formation d'une liaison α 1,4. Dupuy *et al.* (2004) ont montré que cette propriété était due à la présence dans la séquence [IVH]HH[RW][DE][IVL] d'un résidu de tryptophane (W) en lieu et place d'une arginine (R). Ce motif n'a pas été retrouvé dans les domaines catalytiques de FUT10 et FUT11 (Figure 43), mais il existe aux mêmes positions relatives une séquence (FYGTDF) qui s'avère être parfaitement conservée et spécifique de ces deux enzymes chez les mammifères (Mollicone *et al.*, 2009).

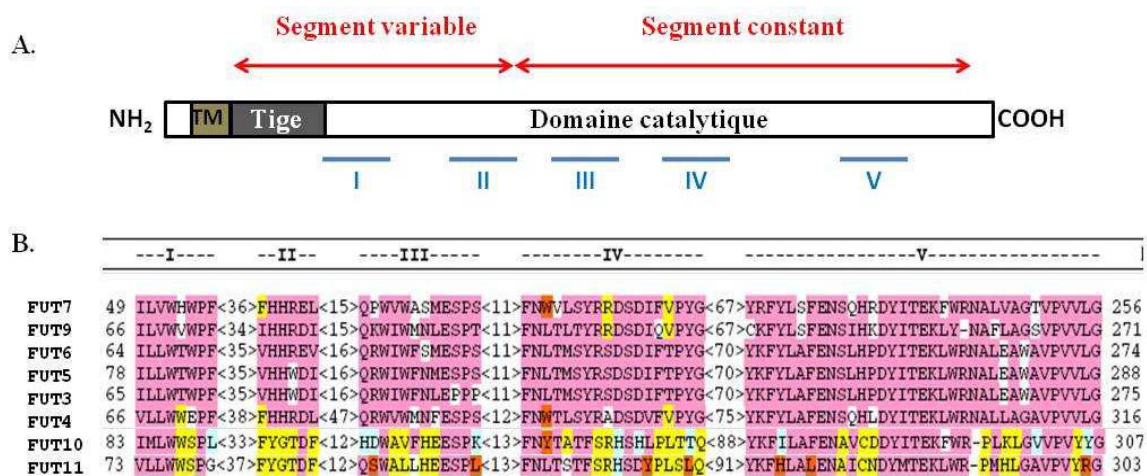


Figure 43 : Représentation schématique des α 1,3/4-fucosyltransférases humaines (d'après Mollicone *et al.*, 2009). (A) Le segment constant correspond à la zone du domaine catalytique qui présente le plus d'identité entre les différentes enzymes, le segment variable, incluant la région tige et une partie du domaine catalytique, est un segment pour lequel l'état de conservation est moindre. La position relative des différents motifs conservés sur la séquence protéique est indiquée par les traits bleus. En B, l'alignement des séquences des motifs I à V de toutes les α 3,4-FucT (adapté de Mollicone *et al.*, 2009). Les acides aminés conservés à plus de 50% sont indiqués en rose. Respectivement en jaune, bleu pâle et orange sont représentées les acides aminés spécifiquement conservés chez [FUT10 et FUT11], [FUT10] et [FUT11] jusqu'à alors identifiés. Sur chaque ligne, la position du premier acide aminé du motif I et du dernier du motif V sont indiquées, les chiffres entre < > correspondant au nombre de résidus séparant les motifs les uns des autres.

3.1.4.2. Spécificité de substrat des α 3/4-fucosyltransférases

Bien que leurs séquences protéiques soient extrêmement bien conservées, chacune de ces fucosyltransférases présente des spécificités de substrat qui lui sont propres. En théorie, elles ont la capacité de fucosyler toutes les GlcNAc des maillons lactosaminiques mais, comme nous l'avons vu précédemment, elles ont chacune leurs cibles de prédilection (Figure 36). FUT3, autrement appelée enzyme de type Lewis, peut tout aussi bien utiliser les oligosaccharides de type I et II. Cependant, son activité est plus prononcée sur du type I et c'est elle qui sera majoritairement responsable de la

biosynthèse des antigènes Le^a, Le^b et SLe^a. L'autre α 3/4-fucosyltransférase, FUT5, utilise indifféremment les oligosaccharides de type I et II. Par ailleurs, il a récemment été montré que la nature du glycanne portant l'oligosaccharide de type I à une importance sur l'activité de transfert, FUT3 et FUT5 présentant des spécificités différentes (Holgersson et Lofling, 2006).

L'enzyme FUT4 utilise quant à elle des substrats accepteurs de type II sialylés ou non, elle est cependant plus efficace en absence d'acide sialique (Easton *et al.*, 1993). De ce fait, elle est principalement impliquée dans la biosynthèse de l'antigène Le^x mais participe aussi un degré moindre à celle du SLe^x. Les spécificités de substrats que nous venons de décrire pour FUT4 sont également celles qui ont pu être observées pour FUT6 qui possède cette capacité de fucosyler les motifs lactosaminiques de type II sialylés ou non (Mollicone *et al.*, 1992). FUT7 et FUT9 ont des spécificités d'accepteur plus restreintes. En effet, l'enzyme FUT7 est spécialisée dans la biosynthèse de l'épitope SLe^x et n'utilise que des oligosaccharides de type II sialylés (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000). A l'inverse, FUT9 se sert uniquement d'oligosaccharides non sialylés de type II et fucosyle préférentiellement la GlcNAc la plus distale de chaînes polylactosaminiques (Nishihara *et al.*, 1999).

Enfin, les premiers résultats concernant de caractérisation enzymatiques de FUT10 et FUT11 viennent d'être publiés (Mollicone *et al.*, 2009). Cette étude montre que ces deux enzymes ont des propriétés enzymatiques similaires et qu'elles seraient responsable d'une α 1,3-fucosylation de la GlcNAc proximale du chitobiose. De plus, alors que les autres α 3/4-fucosyltransférases préfèrent utiliser de petits accepteurs lactosaminiques, FUT10 préfère utiliser des *N*-glycannes bi-antennés.

3.1.4.3. Organisation génomique des α 1,3/4-fucosyltransférases

Etant donné que ces fucosyltransférases ont des propriétés catalytiques assez proches, l'utilité d'un panel d'enzymes aussi large dépend surtout d'une régulation fine de la transcription. La structure et le profil d'expression de ces gènes a été établie chez l'homme. A l'instar des gènes d' α 2-fucosyltransférases, *FUT3*, *FUT5* et *FUT6* sont regroupés au niveau d'un « cluster » localisé sur le chromosome 19p13.3 (Reguigne-Arnould *et al.*, 1995). Ces gènes possèdent des ORF monoexoniques qui codent pour des protéines particulièrement bien conservées les unes entre les autres (90% d'identité). Le gène *FUT3* est principalement exprimé au niveau du colon, du rein et de l'estomac. Il se compose de 3 exons (A, B et C), l'ORF se situant dans l'exon C (Figure 44). Quatre

transcrits ont été mis en évidence et sont le résultat de phénomènes d'épissage alternatifs, l'exon B possédant deux sites d'épissage internes (Cameron *et al.*, 1995). *FUT5* est un gène transcrit dans le foie et le colon et dont les niveaux d'expression sont très faibles. Ses deux transcrits sont tous les deux constitués de l'exon non codant A et de l'exon codant B (Cameron *et al.*, 1995), leur différence n'étant due qu'à l'utilisation de deux sites différents de polyadénylation (Figure 44). Le dernier gène de ce cluster, *FUT6* (Figure 44), a la structure la plus complexe puisqu'il est constitué de quatre exons 5' non traduits (A à D), d'un exon codant (E) et de deux exons 3'-non codants (F et G). Exprimé majoritairement dans le rein, le colon et les glandes salivaires, les réarrangements des régions 5' et 3' au cours de la transcription permettent l'obtention de 5 transcrits différents.

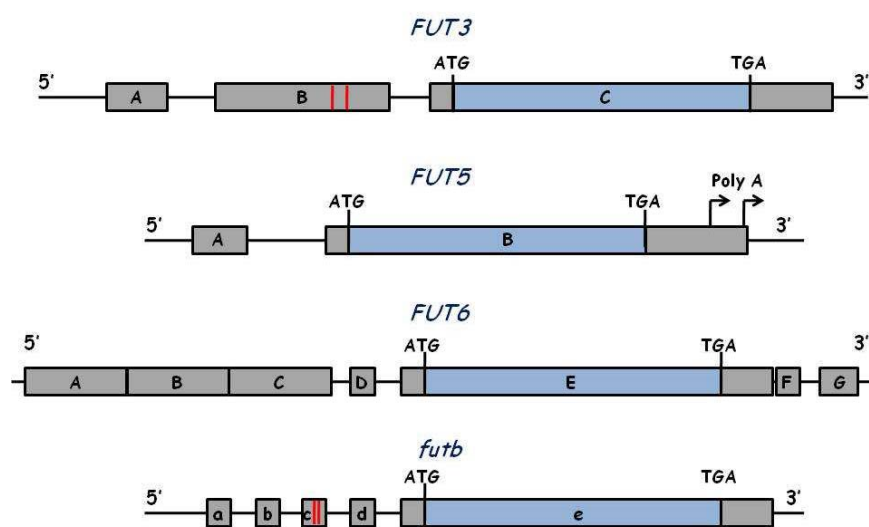


Figure 44 : Organisation génomique du cluster de gènes humains *FUT3-FUT5-FUT6* et du gène bovin *futb* (d'après Cameron *et al.*, 1995 ; Wierinckx *et al.*, 1999). Le gène *futb* est le gène bovin orthologue au cluster humain. Les séquences non traduites sont représentées en gris, les séquences codantes en bleu. Pour *FUT3*, les barres rouges représentent les sites d'épissage et pour *futb* les sites d'initiation de la transcription. Sur *FUT5*, les flèches représentent les sites consensus de polyadénylation.

Cette organisation en cluster est spécifique des hominoïdes (Costache *et al.*, 1997) et n'est donc pas retrouvée chez le bovin. Cependant, il existe chez ce dernier un gène orthologue homologue aux gènes de ce cluster, *futb*, qui code pour une $\alpha 3$ -fucosyltransférase stricte présentant 70% d'identité avec *FUT3*, *FUT5* et *FUT6* (Oulmouden *et al.*, 1997). Ce gène est organisé en quatre exons 5' non codants (*a* à *d*) et un exon codant (*e*) et quatre transcrits ont été décrits ; l'un englobant les 5 exons, les trois autres démarrant par l'exon *c*, dans sa totalité ou au niveau de l'un des deux sites d'initiation de transcription contenu dans sa séquence (Wierinckx *et al.*, 1999).

FUT4 est assigné à la bande 21 du bras long du chromosome 11 humain (McCurley *et al.*, 1995). Ce gène a une structure monoexonique et il a la particularité de contenir deux sites d'initiation de

traduction en phase et très proches l'un de l'autre (Taniguchi *et al.*, 2000^b). La production des différentes formes de FUT4 dépend de l'utilisation de 2 sites d'initiation de la transcription pL et pC (Figure 45), le transcrit long étant plus fortement exprimé que le transcrit court. Cette organisation est également retrouvée chez le bovin mais alors que l'enzyme courte humaine possède un domaine transmembranaire et est localisée dans l'appareil de Golgi, la forme courte bovine est soluble mais inactive (Javaud, communication personnelle). *FUT4* s'exprime aux stades précoces du développement embryonnaire humain (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000) mais est aussi retrouvée exprimée chez l'adulte dans un grand nombre de tissus incluant le cerveau, le col de l'utérus, l'estomac et les leucocytes (Kaneko *et al.*, 1999). L'autre gène dont l'expression est liée aux stades précoces du développement embryonnaire est *FUT9* (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000). Ce gène assigné à la bande q16 du chromosome 6 voit ensuite son expression fortement diminuer chez l'adulte chez lequel il sera principalement exprimé dans le cerveau où il sera responsable de la formation du Le^x (Nishihara *et al.*, 2003).



Figure 45 : Représentation schématique du gène *FUT4* humain (d'après Taniguchi *et al.*, 2000^b). La séquence codante est représentée en bleu, les régions 5' et 3' non codantes en gris. Le gène se caractérise par la présence de deux codons initiateurs de la traduction qui sont respectivement sous la dépendance de deux promoteurs distincts, pL et pC.

Le gène dont le produit est principalement responsable de la formation du SLe^x et qui nous a intéressés au cours de notre étude, *FUT7*, a été cloné chez l'homme en 1994 par Sasaki *et al.* et est localisé sur le chromosome 9 au niveau de la bande q34.3 (Reguigne-Arnould *et al.*, 1995). Il est constitué de deux exons (Figure 46) avec une ORF se répartissant sur chacun de ces exons. Son profil d'expression assez restreint, il est en effet uniquement exprimé par les leucocytes, la rate et le thymus (Kaneko *et al.*, 1999). Le système de régulation de l'expression de *FUT7* est assez original puisque sa région promotrice contient des séquences de fixation pour des facteurs de transcription antagonistes, T-bet et GATA-3 (Chen *et al.*, 2006), le premier étant un activateur, le second un inhibiteur de transcription. Il a ainsi été montré que l'ensemble des interactions entre ces deux protéines étaient à la base d'une régulation fine de l'expression de *FUT7* au cours du « homing » des lymphocytes T (Chen *et al.*, 2006). Alors que *FUT3* et *FUT6* présentent tout comme *FUT1* et *FUT2* un certain nombre de polymorphismes (Soejima et Koda, 2005), il est intéressant de noter

que *FUT7* et *FUT4* ne sont pas polymorphes, les fonctions associées à ces deux gènes apparaissant comme essentielles. Cependant, une mutation non sens (G329A ; ARG¹¹⁰→Gln) a été identifiée chez *FUT7* (Bengtson *et al.*, 2001). Située juste derrière le motif II des α 1,3-fucosyltransférases (Figure 46), elle induit l'inactivation de l'enzyme. Cette perte d'activité *FUT7* chez les individus homozygotes porteurs de cette mutation a des répercussions phénotypiques dont la formation accrue d'ulcères, le développement de diabète insuline-indépendant ou encore de l'ostéoporose (Bengtson *et al.*, 2001).

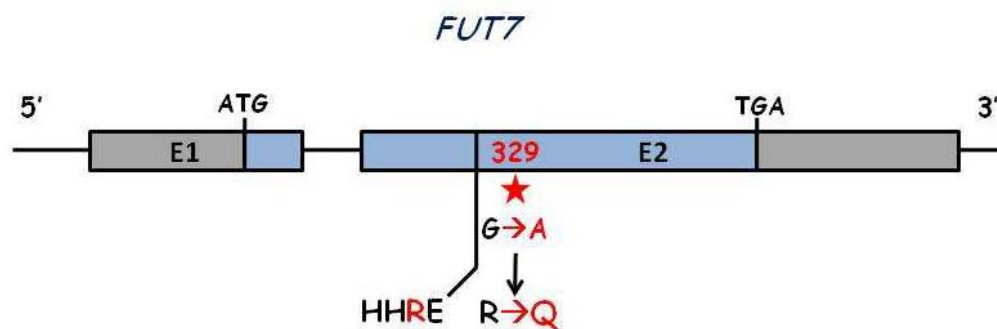


Figure 46 : Représentation schématique du gène *FUT7* humain. Les zones représentées en gris sont non codantes, et en bleu codantes. Le trait noir vertical indique la position relative de la séquence codant le motif II des α 1,3-fucosyltransférases (HHRE), l'étoile rouge celle de la mutation non sens G329A, Arg¹¹⁰ (R) → Gln (Q) découverte par Bengtson *et al* en 2001.

Les gènes *FUT10* et *FUT11*, respectivement localisés sur les chromosomes 8p11.23 et 10q22.2 (Coullin *et al.*, 2003), présentent des organisations qui sont de nouvelles exceptions à la structure monoexonique des gènes de fucosyltransférases golgiennes. *FUT10* se compose de 7 exons et sa structure est de loin la plus complexe. En effet, son cadre de lecture est réparti sur 4 exons (2, 5, 6 et 7) et renferme 3 sites d'initiation de la traduction et deux codons STOP (Figure 47). Quatre types de transcrits alternatifs ont été décrits, ceux prenant en compte le premier ATG codent des protéines membranaires, les transcrits dont la traduction débute au niveau des ATG 2 et 3 amenant à la synthèse de protéines solubles et actives (Mollicone *et al.*, 2009). *FUT10* est exprimé au stade embryonnaire chez l'homme et par le cerveau chez l'adulte. *FUT11* est quant à lui constitué de 3 exons (Figure 47) dont chacun contient une partie de l'ORF. Les différents transcrits alternatifs résultent de l'utilisation d'un des deux codons STOP présent dans l'exon 3.

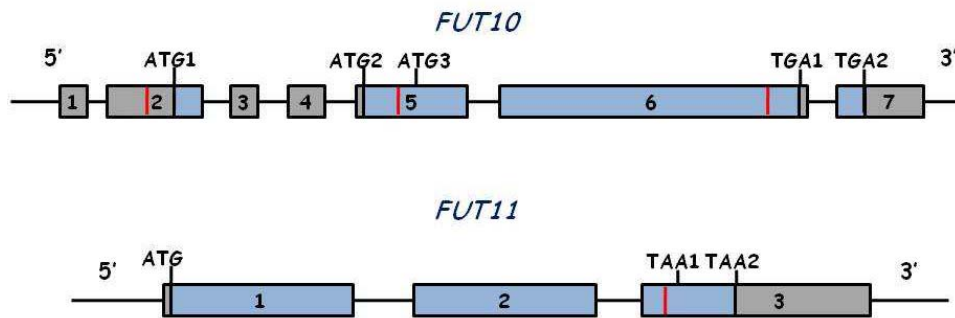


Figure 47 : Représentation schématique des gènes *FUT10* et *FUT11* humains. Les zones représentées en gris sont non codantes, en bleu les régions codantes. Les traits rouges précisent la position des sites consensus d'épissage alternatif.

3.2. Fonctions des antigènes tissulaires de type Lewis

Nous citerons ici une liste non exhaustive des fonctions qui peuvent être attribuées aux antigènes de cette famille. Compte tenu du fait que mes travaux de thèse se sont en partie orientés sur l'étude de *FUT7*, les exemples que nous allons développer concerneront majoritairement l'antigène Sialyl-Lewis^x dont la biosynthèse dépend principalement de la fucosyltransférase codée par ce gène.

3.2.1. L'adhésion cellulaire

L'adhésion et la migration cellulaire sont des processus particulièrement importants au cours du développement, de la cicatrisation ou encore de la réponse immunitaire. Ces processus assez complexes s'effectuent en plusieurs étapes dont certaines font intervenir les antigènes Lewis et en particulier le Sialyl-Lewis^x.

Le cas du recrutement leucocytaire au site inflammatoire, qui se caractérise par trois étapes distinctes (Figure 48), est particulièrement intéressant. La première de ces étapes met en œuvre une interaction de faible affinité entre les sélectines E, P, ou L avec leurs ligands. Également appelée étape de « rolling », elle a pour but de ralentir le déplacement des leucocytes dans la circulation sanguine et de les faire adhérer à la paroi endothéliale. Cette proximité entre le leucocyte et la paroi endothéliale favorise l'activation de cellules immunitaires par les chimiokines produites lors de l'inflammation (Kunkel *et al.*, 2002). Cette stimulation a comme conséquence une forte hausse de la production des intégrines à la surface leucocytaire (Figure 48). Ces intégrines peuvent alors interagir avec leurs ligands exprimés par la paroi endothéliale activée et c'est cette interaction qui

va fixer fermement la cellule immunitaire au capillaire (Bunting *et al.*, 2002). L'arrêt complet du leucocyte sur la paroi vasculaire permet d'initier la dernière étape du recrutement de la cellule immunitaire au site inflammatoire. Cette étape dite de transmigration ou de diapédèse consiste à faire passer le leucocyte au travers de la paroi endothéliale, ce dernier se retrouvant alors dans le tissu où doit agir (Tu *et al.*, 1999).

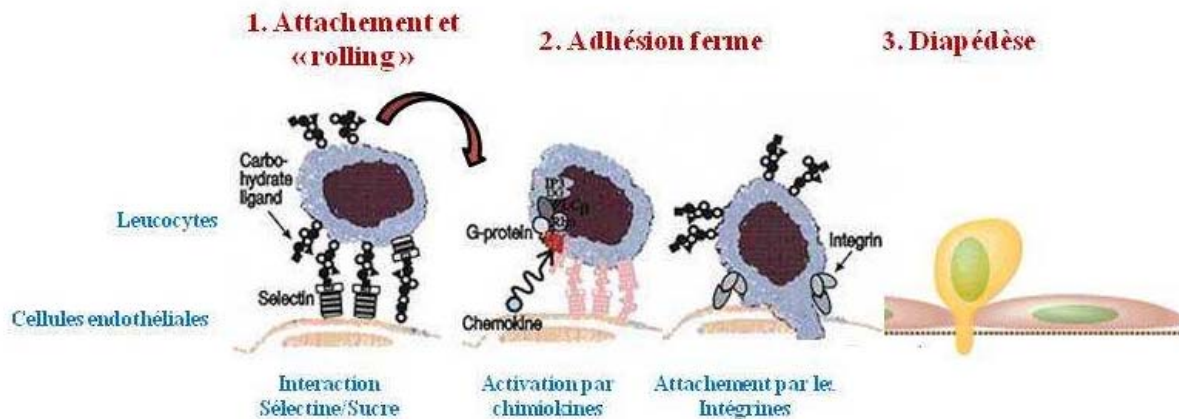


Figure 48 : Représentation schématique du recrutement leucocytaire au site inflammatoire. Le leucocyte est d'abord ralenti le long de la paroi endothéliale par des interactions de faible affinité entre les séllectines et leurs ligands glycaniques (1). Après avoir été activé, il est arrêté grâce à une interaction forte des intégrines et de leurs ligands (2). La dernière étape consiste au franchissement de la paroi endothéliale en direction des tissus inflammatoires, cette étape étant aussi appelée diapédèse (3).

Les séllectines sont des glycoprotéines transmembranaires de type I présentées par les cellules endothéliales (séllectines E et P) ou la membrane leucocytaire (séllectine L). Elles sont composées d'une série de motifs similaires à ceux des protéines du complément, d'un domaine EGF-like et présentent en position N-terminale un domaine lectine. Les ligands naturels de ces séllectines sont les antigènes Sialyl-Lewis^x (SLe^x) portés par des glycoprotéines et des glycolipides. Certains isomères du SLe^x, tels que l'épitope VIM-2 (Figure 49), dont le fucose est porté par un maillon lactosaminique interne, ou le Sialyl-Lewis^a sont également de bons ligands ; ce dernier n'est d'ailleurs pas exprimé par les leucocytes (Berg *et al.*, 1991).

La nature de la protéine arborant le SLe^x a également son importance dans l'efficacité de l'interaction séllectine-sucre. Ainsi, il a été montré que la liaison de la séllectine P est optimale lorsque le motif glycanique est porté par la protéine PSGL-1. Sur celle-ci, le SLe^x a été identifié sur deux types de O-glycannes, l'un à core 2 sur lequel est greffé 3 groupements lactosaminiques fucosylés, l'autre n'étant qu'un simple O-glycanne de core 2 (Figure 49). Leppanen *et al.* (2002) ont montré que l'affinité des séllectines était beaucoup plus élevée pour le glycanne polylactosaminique ce qui explique que le processus de recrutement du leucocyte via les séllectines P dépend de la

stœchiométrie de ces deux glycanes et donc des niveaux d'expression des enzymes qui les forment. Bien que PSGL-1 soit également un ligand de choix pour la sélectine E, il semble que celle-ci se fixe principalement sur le SLe^x porté par les *N*-glycanes de la protéine leucocytaire ESL-1 (Stegmaier *et al.*, 1995). Des ligands des sélectines L ont également été identifiés, ce sont les protéines GlyCAM, CD34, MadCAM, etc qui ont la particularité de porter des antigènes Sialyl-6-Sulfo Lewis^x (Smith *et al.*, 1996).

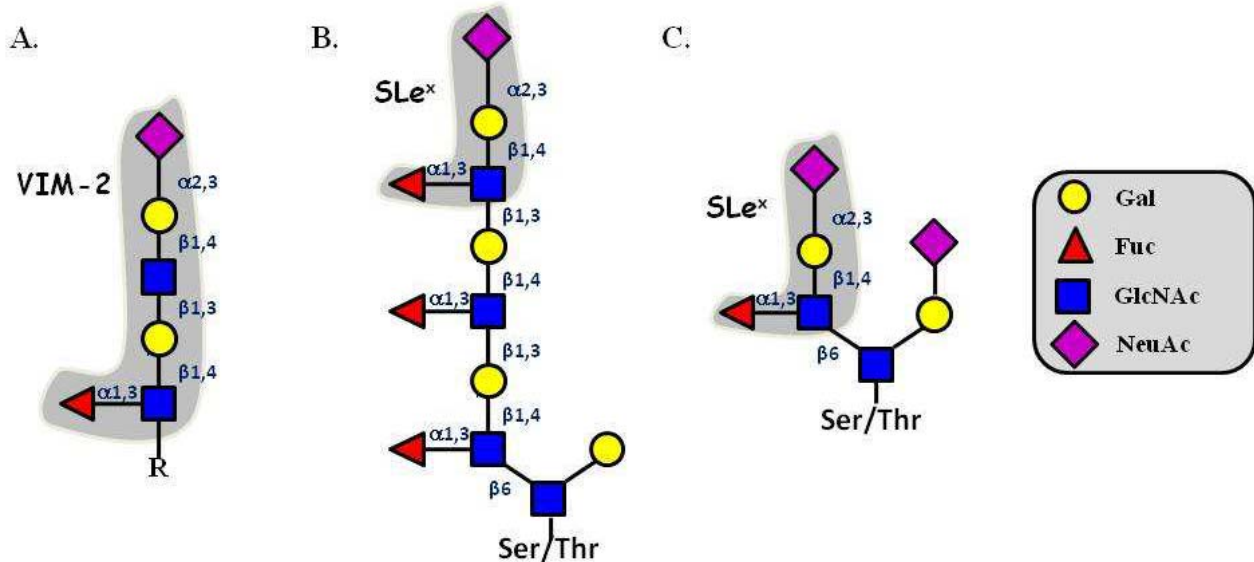


Figure 49 : Les ligands glycaniques des sélectines (d'après Lowe, 2003). En A, L'antigène VIM-2 est un isomère du SLe^x composé de deux unités lactosaminiques dont seule la GlcNAc interne est fucosylée. B et C représentent les O-glycannes de la protéine PSGL-1 présentant l'antigène SLe^x. La structure B est un glycanne de core 2 allongé par lactosamines fucosylées, l'autre glycanne un simple core 2 sur lequel est directement présent le SLe^x. Les épitopes reconnus par les sélectines sont grisés.

Concernant la fucosylation, c'est FUT7 qui est majoritairement responsable de la formation du SLe^x. En effet, des souris déficientes pour l'enzyme FUT7 présentent une leucocytose et une très forte diminution de la diapédèse des leucocytes vers les tissus inflammatoires (Maly *et al.*, 1996). Par ailleurs, chez l'homme, les individus porteurs de la mutation faux sens G329A du gène *FUT7* présentent un taux de SLe^x très faible malgré un mécanisme compensatoire de surexpression de *FUT4*. Le phénotype associé est pourtant moins sévère que celui observé chez la souris, le processus de « rolling » étant toujours actif (Bengtson *et al.*, 2002).

Enfin, tous les mécanismes que nous avons décrits dans ce paragraphe sont également utilisés lors de processus physiologiques tels que la domiciliation leucocytaire dans les organes (Kannagi *et al.*, 2002 ; Kawashima, 2006) ou encore la différenciation cellulaire (Julien *et al.*, 2007).

3.2.2. Sensibilité aux agents infectieux

L'accessibilité des antigènes Lewis en font de bons points d'entrée dans l'organisme pour certains pathogènes. De plus, certaines bactéries comme *Helicobacter pylori* (Webb et Blaser, 2002) ou *Streptococcus pyogenes* (Hirota *et al.*, 1995) vont même jusqu'à présenter sur leur propre LPS des antigènes Lewis qui leurs confèrent plusieurs avantages. En effet, compte tenu du fait que les muqueuses gastriques sécrètent de nombreuses glycoprotéines exposant les structures Le^a, Le^b, Le^x et Le^y, il a été proposé que les antigènes Lewis exprimés par *H. pylori* pourraient servir de structure leurre au pathogène afin d'éviter toute reconnaissance par le système immunitaire et ainsi favoriser une infection sur le long terme (Appelmelk *et al.*, 1997). Outre ce rôle de camouflage, il a été montré que le SLe^x exprimé par *S. pyogenes* aidait cette bactérie à adhérer à la paroi endothéliale en se fixant sur les sélectines exposées, l'interaction hôte-pathogène permettant ainsi d'initier la réponse inflammatoire (Hirota *et al.*, 1995).

3.2.3. Antigènes Lewis et cancer

Au cours du processus de cancérisation, un des changements cellulaires des plus fréquemment observés est l'altération de la glycosylation. Les cellules tumorales expriment bien souvent des antigènes glucidiques qui ne sont pas produits par les cellules normales, ou en surexpriment certains autres dont la représentation excessive a des conséquences physiologiques dramatiques. Les antigènes SLe^a et SLe^x font partie des déterminants glucidiques qui voient leur expression fortement modifiée au cours de nombreux cancers, leur présence étant souvent associée à la formation de métastases par un mécanisme qui rappelle celui de la migration et de la diapédèse leucocytaire durant l'inflammation (Kannagi, 2004). En effet, les cellules tumorales ont la capacité d'induire l'expression des sélectines E par les cellules endothéliales, l'interaction sélectine-SLe^{x/a} qui s'en suit permettant à la cellule cancéreuse de quitter la tumeur primaire, gagner la circulation sanguine et enfin de coloniser les tissus sains (Kannagi, 2004). C'est ainsi que ces antigènes glucidiques sont utilisés comme marqueurs de diagnostic de cancer comme le cancer mammaire canin (Pinho *et al.*, 2007), mais aussi comme marqueurs de mauvais pronostic comme il a pu être observé pour le cancer de la vessie chez l'homme (Numahata *et al.*, 2002).

3.2.4. Les antigènes Lewis comme molécules thérapeutiques

Nous venons de le voir dans les paragraphes précédents, les interactions entre les antigènes Sialyl-Lewis^{x/a} et les sélectines jouent des rôles primordiaux dans les mécanismes de l'adhésion cellulaire, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. Moduler ou limiter ces interactions peut donc s'avérer être très intéressant et de nombreuses études tendent à prouver l'utilité thérapeutique de molécules dont les oligosaccharides contiennent des antigènes de type Lewis.

Par exemple, un acte chirurgical pulmonaire peut provoquer une réponse inflammatoire forte. Bien que le recrutement leucocytaire soit un phénomène particulièrement nécessaire pour limiter le risque d'infection postopératoire, la présence excessive de cellules immunitaires peut avoir des conséquences secondaires comme l'apparition d'épisodes d'asthme (Vanderslice *et al.*, 2004). Dans ce cas, l'utilisation transitoire d'oligosaccharides présentant le SLe^x peut interférer dans l'étape de « rolling » en bloquant les sites de fixation des sélectines, et, de ce fait, empêcher un recrutement trop important des leucocytes (Romano *et al.*, 2005).

Une utilisation d'oligosaccharides en temps qu'inhibiteur de l'adhésion microbienne a également été envisagée en remplacement de la thérapie par antibiotiques (Sharon *et al.*, 2006). En effet, l'initiation de l'infection résulte dans beaucoup de cas de la liaison entre l'hôte et le pathogène. Ainsi, l'injection de molécules présentant des antigènes de type Lewis pourrait contribuer à empêcher l'adhésion de bactéries comme *H. pylori* qui utilisent le Le^b (Ilver *et al.*, 1998), le SLe^x (Mahdavi *et al.*, 2003) ou le Le^x (Edwards *et al.*, 2000) pour se fixer à l'épithélium gastrique.

Nous avons précédemment discuté de l'importance de l'interaction entre les sélectines et les antigènes SLe^{a/x} au cours de la formation de métastases (paragraphe 3.2.3.). Une étude récente (Mathieu *et al.*, 2007) laisse entrevoir des pistes intéressantes quant à l'utilisation des fucosyltransférases dans la thérapie génique du cancer. Ce travail montre en effet que la surexpression du gène *FUT1* dans des cellules d'hépatocarcinome inhibe la formation des capillaires et la croissance tumorale, ces observations étant expliquées par une forte augmentation de l'expression des antigènes Le^b et Le^y au dépend des antigènes SLe^a et SLe^x.

POSITIONNEMENT DU SUJET

POSITIONNEMENT DU SUJET

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les épitopes glucidiques sialyllactosamine et sialyl-Lewis^x participent à des fonctions physiologiques essentielles. Cependant, chez le bovin, toutes les sialyl et fucosyltransférases intervenant dans leurs biosynthèses n'ont pas été identifiées. Ainsi, pour enrichir les connaissances sur la formation et les fonctions associées à ces deux motifs chez *Bos taurus*, j'ai entrepris dans un premier temps le clonage moléculaire et l'étude fonctionnelle des gènes *ST6Gal II* et *fut7* et me suis intéressé dans un second temps aux rôles que pourraient jouer l'un et l'autre de ces gènes au cours de la réponse inflammatoire

Les deux parties suivantes de ce manuscrit, « Matériels et méthodes » et « Résultats-discussion », décrivent l'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse. Les résultats sont scindés en trois chapitres distincts. Ainsi, dans un premier chapitre, nous parlerons de l'étude que nous avons réalisée sur le gène bovin *bST6Gal II* qui code pour une β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase. Nous y faisons rapport de l'identification de ce gène au sein du génome bovin et de son organisation structurale, de l'amplification à partir d'ADNc de cerveau et de l'expression de sa région codante dans un système d'expression hétérologue eucaryote, ceci afin de déterminer les spécificités de substrat de la sialyltransférase qu'il code. Ce travail descriptif a enfin été achevé par la détermination du profil d'expression et de la régulation transcriptionnelle de *bST6Gal II* au niveau tissulaire. Notre étude s'est ensuite orientée sur des aspects plus fonctionnels. Nous avons ainsi analysé l'expression de ce gène en conditions inflammatoires en utilisant comme modèle d'étude des cellules épithéliales de glande mammaire.

Le deuxième chapitre rend compte des travaux que nous avons menés sur un autre gène de la glycosylation, le gène *fut7*, codant pour une α 1,3 fucosyltransférase et responsable de la biosynthèse de l'épitope Sialyl-Lewis^x. Nous y présenterons le clonage et l'organisation du gène, une étude de son profil d'expression tissulaire et de sa spécificité de substrat. Enfin, nous positionnerons ce gène au sein du génome bovin et nous ferons état des différents polymorphismes connus à ce jour sur ce gène.

L'analyse que nous avons faite des résultats obtenus dans les deux premiers chapitres nous a ensuite amenés à effectuer une étude structurale des oligosaccharides du lait. Ce dernier chapitre de résultats nous permettra d'exposer l'avancée des travaux de caractérisation des oligosaccharides du lait de deux populations de brebis différentes, la première étant sensible à l'apparition de mammite, la seconde présentant une résistance à cette pathologie. Une discussion de l'ensemble des résultats et des perspectives envisageables à l'issue de cette thèse terminera ce manuscrit.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

Tous les oligonucléotides ont été synthétisés par MWG (Allemagne). La polymérase DyNazyme EXT DNA polymerase vient de chez Ozyme (France). Le CMP-[¹⁴C]Neu5Ac (10,6 GBq.mmol⁻¹) et le GDP-[¹⁴C]fucose (310 mCi/mmol) viennent de chez Amersham Pharmacia Biotech (USA). Le milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 4,5 g.l⁻¹ de glucose et le sérum de veau fœtal proviennent d'Eurobio (France). Le milieu RPMI 1640 contenant 4,5 g.l⁻¹ de glucose, l'Amphotericine B, un antifongique, les interleukines humaines IL-1, IL-6 et le TNF α proviennent de la firme Sigma (USA). La L-Glutamine, le tampon HEPES 1M, les acides aminés non essentiels, le cocktail d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine), la trypsine EDTA 1X ont été achetés chez GIBCO BRL (France). Les oligosaccharides de Type I et II couplés à un groupement octyl nous ont été donnés par le Dr. Claudine Augé (UMR CNRS 8614, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay), les oligosaccharides LacdiNAc et les oligosaccharides sialyl- α 2,3 et α 2,6-lactosamine nous ont été fournis par la société Lectinity (Russie). Les cellules épithéliales de glande mammaire bovine nous ont été données aimablement par le Dr. Pascal Rainard (INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, France). Les échantillons de lait de brebis nous ont été aimablement fournis par le Dr. Rachel Rupp (INRA, Castanet-Tolosan, France)

2. Méthodes

2.1. Techniques de bases de biologie moléculaire

2.1.1. Extraction et analyse des ARN totaux

Des ARNs totaux ont été extraits à partir de 250 mg de différents tissus bovins : cerveau, glandes mammaires et salivaires, thymus, poumon, rate, muscle squelettique, colon, testicules et tissu adipeux. L'extraction a été effectuée en respectant les indications contenues dans le protocole du RNeasy midi kit de QIAGEN.

Des préparations d'ARNs totaux ont également été effectuées à partir de 3.10^6 cellules épithéliales de glande mammaire ou de cellules COS 1. Les mini préparations d'ARNs totaux ont été réalisées en suivant les conditions expérimentales du kit RNeasy mini kit de QIAGEN.

Que ce soit pour les préparations d'ARNs de tissus bovins ou de cellules en culture, la qualité de chacun des échantillons a été vérifiée. Cette analyse qualitative a été réalisée à l'aide de l'Agilent 2100 bioanalyzer qui calcule le rapport de concentration entre les ARNs ribosomaux 28s et 18s. Les échantillons dont le ratio 28s/18s était inférieur à 1,8 et supérieur à 2,2 ont été exclus. Par ailleurs, la concentration en ARNs totaux des échantillons de qualité suffisante a été déterminée à l'aide du NanoDrop 1000.

2.1.2. Synthèse du premier brin d'ADNc

En fonction des objectifs, différents protocoles ont été utilisés pour synthétiser les premiers brins d'ADNc. Concernant le clonage à partir des tissus bovins des parties codantes des gènes *ST6Gal II* et *fut7*, les premiers brins d'ADNc ont été synthétisés grâce à la reverse transcriptase ImProm II RT de Promega à partir de 2 μ g d'ARN totaux. Un premier lot d'échantillons a été préparé en utilisant comme amorces oligonucléotidiques des hexamères aléatoires, et, dans un second temps, certains tissus d'intérêt ont été retrotranscrits à l'aide d'amorces spécifiques des deux gènes étudiés.

Les premiers brins d'ADNc pour les analyses d'expression tissulaire et de PCR quantitative proviennent de la retrotranscription de 10 μ g d'ARN totaux, en présence d'hexamères aléatoires, et en utilisant le High-capacity cDNA Archive kit d'Applied Biosystems. Les conditions expérimentales décrites dans le kit ont été appliquées.

Enfin, l'analyse des régions 5'UTR des transcrits des gènes *ST6Gal II* et *fut7* a été réalisée sur des ADNc issus de la retrotranscription de 2 μ g d'ARN totaux en suivant le protocole du kit 5'/3' RACE, 2nd generation de Roche. Les amorces oligonucléotidiques qui ont été utilisées sont spécifiques des gènes étudiés.

2.1.3. Séquençage des échantillons d'ADN

Le séquençage des échantillons d'ADN d'intérêt a été effectué en suivant un protocole mis au point dans le laboratoire. La réaction de séquençage en elle-même se compose d'une étape de dénaturation de 10 sec à 96°C, d'une étape d'hybridation de 5 sec à 55°C et d'une étape d'élongation de 4 min à 60°C, ces 3 étapes étant répétées 25 fois. Pour le séquençage, la quantité d'ADN utilisée varie entre 200 et 400 ng et le mélange réactionnel est constitué de 3 µl du Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem), 4µl de 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystem), 1µl d'amorce de séquençage 10 µM et 2% finaux de DMSO (v/v).

Les produits de réaction de séquence sont ensuite purifiés sur colonne de Sephadex G50 super fine (Amersham) coulée dans des microplaques à fonds filtrants (Millipore). La plaque de récupération est alors séchée 10 min à 94°C et les produits sont repris dans 10 µl de formamide puis dénaturés 3 min à 94°C. Les séquences purifiées dans le formamide sont alors injectées dans la colonne pour analyse dans le séquenceur 3130 genetic analyzer d'Applied Biosystem.

2.2. Clonage et analyse génétique

2.2.1. Clonage moléculaire de l'ORF du gène *ST6Gal II* bovin

Le contig WGS (AAFC 03085877.1) a été identifié par une analyse BLAST des banques de données du génome bovin en utilisant comme sonde la séquence humaine de l'ARNm de la seconde β -Galactoside α 2,6-sialyltransférase, *ST6Gal II* (NM_032528). De fortes similitudes ont été trouvées entre les deux séquences et des amorces nucléotidiques ont pu être dessinées. Des analyses complémentaires ont permis de vérifier que ces amorces ne permettaient pas l'amplification du gène *ST6Gal I*.

Le couple d'amorce 1 (Tableau IV) a ensuite été utilisé pour amplifier par PCR l'ORF du gène *ST6Gal II* à partir d'ADNc de différents tissus bovins (paragraphes 2.1.1. et 2.1.2.). Les 25 µl du mélange réactionnel sont composés d'une unité de DyNzyme EXT, 0,4 µM de chaque amorce,

0,2 mM de dNTP et de 0,2 µg d'ADNc. L'amplification s'est déroulée dans les conditions suivantes :

Tableau IV : Amorces et couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés pour l'étude de *ST6Gal II*.

Paire	Nom de l'amorce	Séquence
1	<i>bGal II f1</i>	5'- GGTCGCCATCTGAGGACACAGGCCGC -3'
	<i>bGal II r1</i>	5'- GCCTCCAGGGTGCCTTCCAGCATCTCCG -3'
2	<i>bGal II f2</i>	5'- CGTGGACCTGCCATGAAACCGCACCTGAAGC -3'
	<i>bGal III r2</i>	5'- GGCTGGCCCCTCAGCCACCTGGCGG -3'
3	<i>bGal II if1</i>	5'- ATCCTCAACTCATCTCTGGGCGAGG -3'
	<i>bGal II ir1</i>	5'- CGTAGCCACGTGTAGGAGCAG -3'
4	<i>bGal II if2</i>	5'- CTGCTCCTACACGTGGCTACG -3'
	<i>bGal II ir2</i>	5'- TCCATGAAGTGGTAGCTGGGGTTGG -3'
5	<i>bGal II if3</i>	5'- GGTGGCCTGGGACCCAGC -3'
	<i>bGal II ir3</i>	5'- GGTTGTAATCTGGCTTCTTGTACC -3'
6	<i>bGal II exF</i>	5'- GCCCAACCCGCCGTCTCTGG -3'
	<i>bGal II exR</i>	5'- GGTAGGGCTCGTGGTAGTGACACAGG -3'
7	<i>COX 2 F</i>	5'- TCTTCCTCCTGTGCCTGAT -3'
	<i>COX 2 R</i>	5'- CTGAGTATCTTTGACTGTGG -3'
8	<i>bGal II qF</i>	5'- TCCAGGAGAACACGAAGGAGAAGA -3'
	<i>bGal II qR</i>	5'- GGCTCGTGGTAGTGACACAGGTCT -3'
9	<i>bGal IqF</i>	5'- TCTCAGTTGGTCACCACAGAAGCA -3'
	<i>bGal IqR</i>	5'- GGGATTCCTGTACCACTTTGGGAT -3'
10	<i>GAPDH s</i>	5'- GTGAAGCAGCGCTCAGAGG -3'
	<i>GAPDH r</i>	5'- TTGAAGTCGCAGGAGACAACC -3'
11	<i>Oligo d(T)-Anchor primer</i>	5'- GACCACGCGTATCGATGTCTGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
	<i>bGal II RA2</i>	5'- CGGGTCTCCAGAAAGGAGAAGGAGC-3'
12	<i>PCR Anchor primer</i>	5'- GACCACGCGTATCGATGTCTGAC-3'
	<i>bGal II RA3</i>	5- CCATGCAAACACCCCGCAGAGC-3'
13	<i>bGal II t1</i>	5- ACTTCTTGTCTGTAGGCATTCA-3'
	<i>bGal II tr</i>	5- CTGTCGGTGAAGTAGAGGAAGA-3'
14	<i>bGal II t2</i>	5- GCGCGGCGTACGGAAAAG-3'
	<i>bGal II tr</i>	5- CTGTCGGTGAAGTAGAGGAAGA-3'
15	<i>bGal II t3</i>	5- CGGGAGAAGAAGATGTGACA-3'
	<i>bGal II tr</i>	5- CTGTCGGTGAAGTAGAGGAAGA-3'
16	<i>bGal II Lf^(a)</i>	5- GTAAGAATT CAAT GAAACCGCACCTGAAG-3'
	<i>bGal II R^(b)</i>	5- GCAGGT TAC CGGCTGGCCCCTCAGGCA-3'
17	<i>bGal II Sf^(a)</i>	5- AGCGAATT CAG CGCCAGCTCCTTCTC-3'
	<i>bGal II R^(b)</i>	5- GCAGGT TAC CGGCTGGCCCCTCAGGCA-3'
	<i>bGal II RA1*</i>	5'- CGTTCAAAGCCATCTCCGGCC-3'
18	<i>bGal III qF</i>	5'- GTGGTTGAAATACATCGTCTACAA-3'
	<i>bGal III qR</i>	5'-GCAATCCGATGAGGGTGA-3'
19	<i>bGal IV qF</i>	5'-GATTGAGAGCATCCTGAGTGATA-3'
	<i>bGal IV qR</i>	5'-GCTGCGATCTCCATGTAGAA-3'

En gras sont représentés les sites de restriction pour *EcoRI* (a) et *KpnI* (b) ; V= A, C ou G ; * : RT 5' RACE

une première étape de dénaturation de 5 min à 94°C suivie de 40 cycles incluant une étape de dénaturation d'une minute à 94°C, une étape d'hybridation de 45sec à 62°C et une étape d'élongation de 2 minutes à 72°C. Une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C a été ajoutée. Ces produits de PCR ont ensuite été dilués au 1/10^{ème} et 2 µl de la dilution sont utilisés pour effectuer une PCR « nichée » en utilisant comme oligonucléotides la paire d'amorces 2 (Tableau IV) et ce dans les mêmes conditions d'amplification que la première PCR. Un fragment d'environ 1500 pb a été obtenu et inséré pour séquençage dans le vecteur Topo TA sequencing (Invitrogen).

2.2.2. Amplification des introns du gène *bST6Gal II*

Les introns 1, 2 et 3 ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique bovin en utilisant respectivement les couples d'amorces 3, 4 et 5 (Tableau IV). Pour amplifier l'intron 2, le mélange réactionnel comprend 1 unité de DyNzyme EXT, 0,4 µM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP et 0,1 µg d'ADN génomique. Les conditions d'amplification sont : après une première étape de dénaturation de 3 min à 94°C, 38 cycles qui incluent 1 min de dénaturation à 94°C, une étape d'hybridation à 58°C durant 1 min et une étape d'élongation de 2 min à 72°C sont effectués. Enfin, une élongation finale de 7 min à 72°C a été ajoutée. Pour l'amplification des introns 1 et 3, la PCR a eu lieu dans un volume réactionnel de 25µl comprenant 1,5 unité de DyNzyme EXT, 0,5 µM de chacune des amorces, les dNTP à une concentration finale de 0,2 mM et 0,1 µg d'ADN génomique. La réaction a été réalisée dans les conditions suivantes : 3 min de dénaturation à 94°C suivie de 40 cycles contenant une étape de dénaturation de 45 sec à 94°C, une étape d'hybridation de 35 sec à 60°C et une étape d'élongation de 4min 15 sec à 72°C. Au cours des 7 premiers cycles, des conditions de « touchdown » PCR ont été utilisées c'est-à-dire qu'à chacun de ces cycles la température d'hybridation a été diminuée d'un degré par cycle pour arriver à 60°C, la température de départ étant de 67°C. La PCR se termine par une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits obtenus pour chacune des PCR sont ensuite insérés dans un vecteur (Topo sequencing vector (Invitrogen) pour les introns 2 et 3 et Topo XL TA cloning vector (Invitrogen) pour l'intron 1 pour leur séquençage.

2.2.3. Analyse des régions 5'-UTR des ARNm du gène *bST6Gal II*

L'étude des régions 5' non traduites des transcrits de *bST6Gal II* est réalisée à partir d'ARNs totaux de différents tissus bovins (cerveau, glandes mammaires et salivaires, thymus, poumon, rate, muscle squelettique, colon, testicules et tissu adipeux), ces derniers étant ensuite rétro-transcrits avec l'amorce oligonucléotidique *bGalRAI* (Tableau IV), spécifique du gène *bST6Gal II*. La méthode d'analyse utilisée est la 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) selon le 5'/3' RACE kit, 2nd generation (Roche). Cette technique se compose de 3 étapes en aval de la rétro-transcription (Figure 50) : la fixation d'un adaptateur, une première PCR d'amplification dont les produits servent de matrice pour une seconde PCR dite « nichée ».

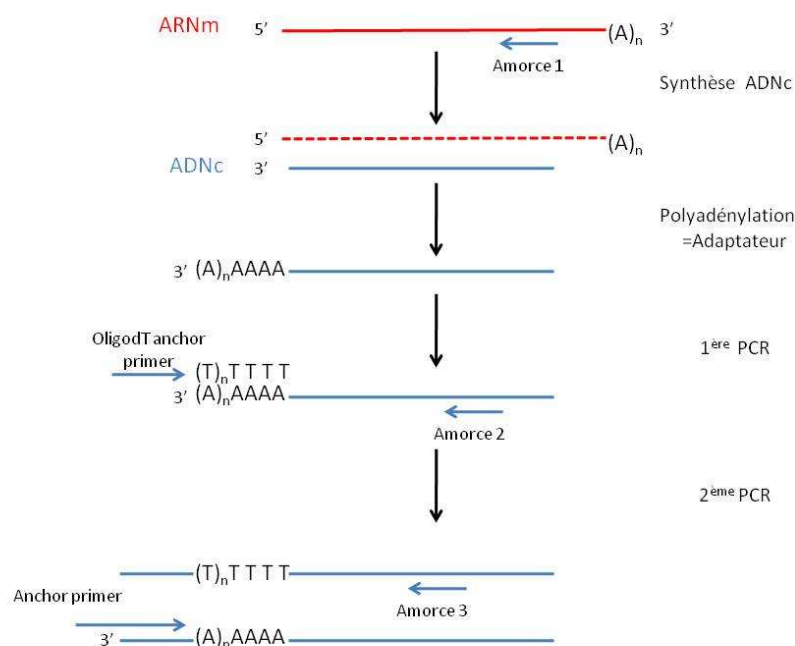


Figure 50 : Représentation schématique de la technique de 5' RACE (selon Roche). Après la synthèse du premier brin d'ADNc en utilisant une amorce spécifique du gène (amorce 1), il y a polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ADNc. Cette queue poly-(A) sert de site de fixation pour l'amorce OligodT anchor primer utilisée en association avec une deuxième amorce spécifique du gène étudié (amorce 2) pour un premier cycle d'amplification. Une dernière PCR est réalisée à l'aide des amorces Anchor primer et une troisième amorce spécifique du gène étudié (amorce 3).

La fixation de l'adaptateur consiste ici au greffage d'une queue poly-(A) sur les extrémités 3' des premiers brins d'ADNc. Cette poly-adénylation est effectuée par une enzyme présente dans le kit : la « Terminal Transferase » en présence de dATP. Que ce soit pour la première PCR d'amplification ou la PCR nichée qui suit, le mélange réactionnel est de 25 μ l et se compose de 1,5

unité de DyNzyme EXT, 0,4 μ M pour chacune des amorces, 0,2 mM de dNTP et 2% de DMSO (v/v). La première PCR (Figure 50) a été faite en utilisant le couple d'amorces 11 (Tableau IV) sur 5 μ l d'ADNc poly-adenylés. La matrice utilisée au cours de la PCR nichée correspond à 1 μ l des produits de la première PCR mis en présence du couple d'amorce 12 (Tableau IV). Pour l'une et l'autre des PCR, les conditions d'amplification ont été similaires et correspondent à celles recommandées par le fabricant du kit, la température d'hybridation des amorces étant de 60°C. Les amplicons obtenus à l'issue de la PCR nichée ont ensuite été sous-clonés dans le Topo TA sequencing vector (Invitrogen) puis séquencés.

2.2.4. Identification de la séquence codante du gène *fut7* bovin

Le WGS AAFC01684977 a été identifié par analyse BLAST des banques de données du génome bovin avec comme sonde les séquences des ARNm des α 1,3-fucosyltransférases VII humaine et murine. Ce contig présentant de fortes ressemblances avec une partie des séquences codantes humaine et murine a permis de définir des amorces oligonucléotidiques.

Tableau V : Amorces oligonucléotidiques utilisés pour l'étude de *fut7*

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
<i>fut7bs1</i>	5'-CCTGTGCGCCAGCTGCCTTCTG-3'
<i>fut7bs2</i>	5'-CACCATCCTTGTCTGGCACTGG-3'
<i>fut7bs3^(a)</i>	5'-GAGAATTCAGGAATGCAGAATGCTGG-3'
<i>fut7bs4</i>	5'-GCCGTGAATGCAGAATGCTGG-3'
<i>fut7bas1</i>	5'-GCAGCGCTCAGGCCTGGAACC-3'
<i>fut7bas2</i>	5'-CAGAAGGCAGCTGGCGCACAGG-3'
<i>fut7bas3</i>	5'-GCTCAGCCAGGGGCGGGCG-3'
<i>fut7bas4</i>	5'-GGCGTCGGCGCCGGCCAGCAGG-3'
<i>fut7bas5</i>	5'-GGCTGGCTGGCAAATGGCCAGTGCC-3'
<i>fut7bas6^(b)</i>	5'-CTGGTACCCACAGCTCAGGCCTGGA-3'
<i>fut7bas7</i>	5'-CAGAAGGCAGCTGGCGCACAGG-3'
Oligo d(T)-Anchor primer	5'- GACCACGCGTATCGATGTTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
PCR Anchor primer	5'- GACCACGCGTATCGATGTTCGAC-3'

En gras sont représentés les sites de restrictions pour *Eco*R1 (a) et *Kpn*I (b)

Le clonage à proprement parlé a été réalisé par PCR à partir d'ADNc de différents tissus bovins décrits dans les paragraphes 2.1.1. et 2.1.2., et aussi à partir d'une préparation d'ADN génomique. L'amplification se déroule dans un milieu réactionnel de 25 µl constitué de 12,5 µl de « pre-aliquoted 2X PCR Master mix » (Abgene), 10% (v/v) de DMSO, 0,3 µM final du couple d'amorces *fut7bs1/fut7bas1* (Tableau V), et, selon le cas, 0,2 µg d'ADNc ou 0,1 µg d'ADN génomique. L'amplification débute par une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 3 min. Elle est suivie de 39 cycles constitués d'une étape de dénaturation de 1 min à 95°C, d'une étape d'hybridation des amorces de 45 sec à 60°C et enfin d'une étape d'élongation à 72°C de 105 sec. La PCR se termine par une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Des PCR semblables ont également été réalisées avec les couples d'amorces *fut7bs2/fut7bas1* et *fut7bs2/fut7bas2*.

L'utilisation de la 5'RACE, dont la méthodologie a été décrite dans le paragraphe 2.2.3. et sur la figure 50, a été nécessaire pour obtenir la totalité de la séquence codante. A partir d'ARN de thymus bovin, la synthèse des premiers brins d'ADNc a été réalisée avec l'amorce *fut7bas3*. Après ajout de l'adaptateur, les 2 PCR suivantes sont réalisées dans le même mélange réactionnel que celui décrit dans le paragraphe 2.2.3. si ce n'est que la concentration finale en DMSO est ici de 8% (v/v). Le couple d'amorces *Oligo d(T)-Anchor primer/fut7bas4* (Tableau V) a été utilisé pour la première PCR alors que le couple d'amorce *PCR Anchor primer/fut7bas5* (Tableau V) a servi au cours de la PCR nichée. Le programme d'amplification déterminé par le fournisseur (Roche) a été suivi avec une température d'hybridation de 60°C. Les différents produits d'amplification ont été sous-clonés dans le Topo TA cloning sequencing vector kit (Invitrogen).

2.2.5. Expression tissulaire des gènes *bST6Gal II* et *fut7*

La détection de la présence des transcrits de *bST6Gal II* et de *fut7* a été effectuée par PCR à partir des ADNc aux ARNm de cellules de dix tissus bovins : cerveau, glandes mammaires et salivaires, thymus, poumon, rate, testicules, tissu adipeux, muscle squelettique et colon.

Pour la recherche des transcrits de *ST6Gal II*, le mélange réactionnel de PCR était constitué de 12,5 µl de « pre-aliquoted 2X PCR master mix » (Abgene), 0,3 µM final d'amorces de la paire 6 (Tableau IV), 0,2 µg d'ADNc et 2% de DMSO (v/v) pour un volume final de 25µl. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C de 3 min suivie de 45 cycles incluant une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, une étape d'hybridation de 30 sec à

60°C et une étape d'élongation de 45 sec à 72°C. Pour terminer, une étape d'élongation finale de 3 min à 72°C a été ajoutée.

L'étude concernant l'expression de *fut7* s'est déroulée dans un mélange réactionnel similaire à celui utilisé pour *ST6Gal II* à la différence de la concentration finale de DMSO qui est ici de 10% (v/v), et ce compte tenu de la richesse en GC de la séquence. Les amorces oligonucléotidiques utilisées sont *fut7bs4/fut7bas2* (Tableau V). Le programme d'amplification utilisé est fait d'une dénaturation de 3 min à 95°C, de la répétition au cours de 40 cycles d'une étape de 1 min à 94°C, d'une seconde de 45 sec à 60°C pour l'hybridation des amorces et enfin de l'étape d'élongation qui dure 105 sec à 72°C. La PCR s'achève par une dernière étape d'élongation de 7 min à 72°C.

Que ce soit pour l'analyse de l'expression de *ST6Gal II* ou *fut7*, le gène de la *GAPDH* a été utilisé comme gène normalisateur. Son amplification a été réalisée à l'aide de la paire d'amorces 10 (Tableau I) et chacune de ces amorces a été utilisée à une concentration finale de 0,3 µM dans un volume réactionnel de 25 µl. Ce mélange réactionnel se compose également de 12,5 µl de « pre-Aliquoted 2X PCR master mix » (Abgene) et 0,2 µg d'ADNc. Les conditions d'amplification sont : une incubation initiale de 3 min à 94°C suivie de 37 cycles comprenant une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 56°C et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec. La technique de « touchdown PCR » pour la température d'hybridation a été appliquée au cours des 7 premiers cycles, la température initiale étant de 62°C pour atteindre la température finale de 56°C, maintenue pour les 30 derniers cycles. Enfin, une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C a été réalisée.

2.2.6. Amplification de l'ORF et de la séquence intronique de *fut7* bovin

L'utilisation, à une concentration finale de 0,3 µM, du couple d'amorces *fut7bs2/fut7bas1* (Tableau V) dans un volume de réaction de 25 µl contenant 12,5 µl de « pre-aliquoted 2X PCR Master mix » (Abgene) et 10% (v/v) de DMSO, a permis l'amplification de la totalité de la région codante en présence 0,2 µg d'ADNc et de cette même région codante avec sa séquence intronique en présence de 0,1 µg d'ADN génomique. Les conditions de PCR utilisées sont identiques à celles employées lors de la PCR qui a permis l'identification de la partie 3' de la région codante du transcrit (paragraphe 2.2.4.).

2.2.7. Etude du niveau d'expression des gènes *ST6Gal I/II* et *ST3Gal III/IV* par RT-PCR quantitative en temps réel

Ce travail a été réalisé sur les ADNc préparés à partir d'ARN totaux de cellules épithéliales de glande mammaire bovine. L'analyse quantitative des transcrits de *ST6Gal I*, *ST6Gal II*, *ST3Gal III*, *ST3Gal IV* a été réalisée avec du SYBR Green (Applied Biosystems) sur l'appareil ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant du 2X SYBR Green Master Mix, les amorces à une concentration finale de 300 nM et 150 ng d'ADNc. Pour chacun des quatre gènes étudiés, les amorces sens et anti sens (respectivement paires 9, 8, 18 et 19 pour *ST6Gal I*, *ST6Gal II*, *ST3Gal III* et *ST3Gal IV*, Tableau IV) ont été placés sur deux exons consécutifs. Les conditions d'amplification impliquent une première étape de dénaturation de 10 min à 95°C suivie de 40 cycles d'amplification avec 15 sec de dénaturation à 95°C et 1 min d'hybridation/amplification à 60°C. Tous les échantillons sont analysés en triplicats et les résultats sont normalisés par rapport au gène de la GAPDH. Par ailleurs, l'analyse du niveau d'expression du gène de la COX 2 a été suivie (couple d'amorce 7 ; Tableau IV) dans les mêmes conditions d'amplification. Ce gène sert de marqueur de la réponse inflammatoire (Léger *et al.*, 2004).

2.2.8. Construction de vecteurs d'expression dans les cellules eucaryotes

Un fragment contenant la séquence codante entière de *ST6Gal II* a été amplifié à partir d'ADNc de cerveau par deux PCR successives utilisant respectivement les couples d'amorces 1 et 16 (Tableau IV). Par ailleurs, un autre fragment d'ADN contenant la séquence codante de *ST6Gal II* délétée des 120 premières paires de bases a été amplifié par PCR à l'aide des couples d'amorces 1 et 17 (Tableau IV). Les conditions de PCR utilisées pour obtenir ces deux fragments sont identiques à celles utilisées dans le paragraphe 2.2.1. L'insertion de sites de restriction *EcoRI* et *KpnI* aux extrémités de chaque fragment durant la seconde PCR permet leur insertion dans des vecteurs d'expression. De même, l'insertion des sites de restriction *EcoRI* et *KpnI* dans un fragment contenant la séquence codante de *fut7* a été réalisée par PCR à partir de l'amplicon obtenu dans le paragraphe 2.2.6. Cette PCR a été réalisée avec les amorces *fut7bs3/fut7bas6* dans les mêmes conditions d'amplification que celles du paragraphe 2.2.5.

Vecteurs et amplicons ont ensuite été digérés par les enzymes *EcoRI* et *KpnI* (Biolabs) pendant 4 heures à 37°C. Les produits de digestion sont alors sous clonés dans les vecteurs d'expression pFlag-CMV-1 et CMV-2 (Sigma ; Figure 51). Les fragments contenant les séquences codantes entières des gènes *ST6Gal II* et *fut7* ont été insérés dans le vecteur pFlag-CMV-2 alors que le fragment de *ST6Gal II* délété des 120 premières paires de bases a été inséré dans le vecteur pFlag-CMV-2. Les ligatures insert-vecteur ont été réalisées avec la T4 DNA ligase (Gibco). Le rapport vecteur-insert varie de 1/5 à 1/10 avec une concentration de vecteur fixée à 50 ng.

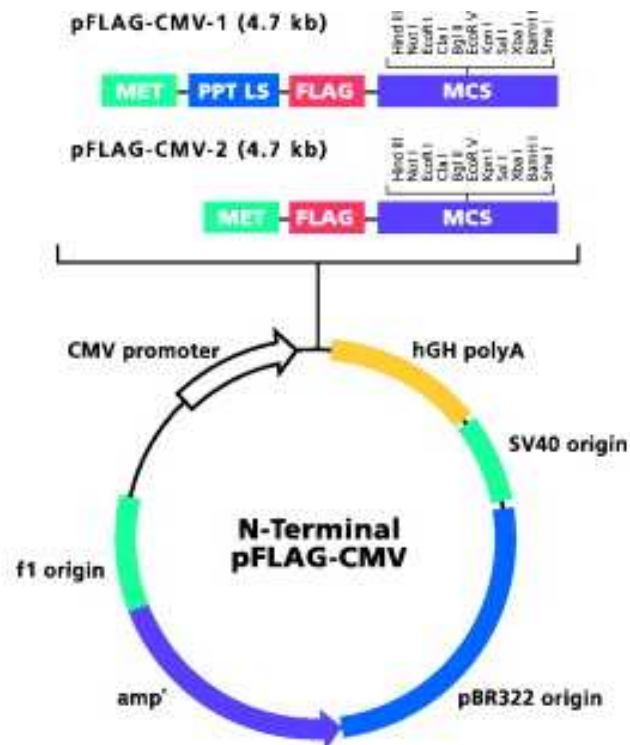


Figure 51 : Carte génétique des vecteurs d'expression pFlag-CMV-1 et 2 (Sigma). Ces vecteurs contiennent un site de polyclonage (MCS) et une séquence codant pour un court peptide de 8 acides aminés détectable par immunochimie. Le vecteur CMV-1 contient également un peptide signal de sécrétion (PPT LS).

2.3. Culture cellulaire

2.3.1. Les cellules COS 1

2.3.1.1. Conservation des cellules

Les cellules, à raison de 2,5 à 5 millions par ml, sont placées dans un cryotube, congelées pendant 24h à -80°C et enfin conservées dans l'azote liquide. Le milieu utilisé est le DMEM : glucose 4,5 g.l⁻¹, SVF 16,5% (v/v), DMSO 10% (v/v).

2.3.1.2. Mise en culture des cellules après décongélation

Les cellules stockées sont décongelées à 37°C puis lavées par 20 ml de milieu DMEM complet (glucose 2 g.l⁻¹, acides aminés non essentiels 1% (v/v), streptomycine (50 UI) et pénicilline (50 g/ml), glutamine 1% (v/v)). Les cellules sont centrifugées 10 min à 290 x g puis à nouveau lavées par 10 ml de PBS (120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM de sels de phosphate). Elles sont enfin resuspendues dans 2,5 à 5 ml de milieu complet DMEM et mises en culture à 37°C en présence de 5% de CO₂.

2.3.1.3. Entretien des cultures cellulaires

Après élimination du milieu de culture par aspiration, les cellules sont lavées par du PBS. Elles sont ensuite décollées de leur support par action de la trypsine (PBS, EDTA 1 mM, trypsine 0,05% (p/v)) pendant 3 min à 37°C. L'action de la trypsine est alors stoppée par addition de milieu complet. Une série d'aspirations/refoulements permet de décoller les cellules encore adhérentes et la totalité des cellules est récupérée par centrifugation (300 x g, 10 min). Elles sont reprises dans 10 ml de milieu DMEM complet. Les cellules sont alors comptées sur lame de Malassez. La remise en culture s'effectue dans des boîtes de 100 mm de diamètre contenant 10 ml de milieu complet dans lequel sont ajoutées 750 000 cellules. Les boîtes sont alors placées à l'étuve à 37°C, 5% de CO₂ pour une durée de 24h lorsque l'incubation précède une transfection ou 72h avant l'entretien.

2.3.1.4. Transfection transitoire des cellules COS-1

Des boîtes de culture de 100 mm de diamètre contenant 2,5.10⁶ cellules sont utilisées pour la transfection. Le réactif est le FuGENE 6 (Roche). Le ratio FuGENE (μl)/ADN (μg) doit être égal à 3:2. Dans notre cas, 18 μl de FuGENE6 sont dilués dans 600 μl de DMEM. Après homogénéisation, un volume correspondant à 6 μg d'ADN plasmidique est ajouté et mélangé par aspiration/refoulement ménagé. La solution de transfection est laissée 45 min à température ambiante.

Pendant ce temps, les cellules sont lavées par 8 ml de PBS. La période d'incubation terminée, le mélange de transfection est déposé goutte à goutte sur les cellules. Enfin, 10 ml de milieu complet sont ajoutés dans les boîtes de cultures. Les cellules sont ensuite incubées 48h à l'étuve (37°C, 5% de CO₂).

Les cellules sont récupérées comme précédemment. Après centrifugation, le culot est repris dans un volume adéquat de tampon de lyse (cacodylate de Na 10 mM, pH6, glycérol 20% (v/v), DTT 1 mM, triton X100 1% (v/v)). Les cellules sont lysées 2h à 4°C sous agitation. Les protéines solubles sont récupérées après centrifugation (10 min, 4°C, 8 000 x g) et dosées selon la méthode de Bradford avec la BSA comme étalon (Bradford, 1976). Pour les protéines recombinantes sécrétées, les milieux de culture sont récupérés.

2.3.2. Les cellules épithéliales de glande mammaire bovine

2.3.2.1. Mise en culture et entretien des cellules

Ces cellules prélevées sur les glandes mammaires sont mises en cultures primaires et sont fragiles. Un tube de 3.10⁶ cellules est décongelé à 37°C dans 40 ml de milieu complet constitué pour 100 ml de 40 ml de DMEM, 40 ml de RPMI 1640, 10 ml sérum de veau fœtal. A ce milieu sont ajoutés de la L-glutamine 2 mM, du pyruvate de sodium 1 mM, du tampon HEPES à 40 mM, de l'insuline 5 µg/ml, de l'hydrocortisone 1 µg/ml, de l'amphotéricine B 0,5 µg/ml et enfin un cocktail d'antibiotique composé de streptomycine (50 UI) et de pénicilline (50 g/ml). Après décongélation, les cellules sont centrifugées 10 min à 200 x g. Après centrifugation, les cellules sont lavées par 30 ml de PBS. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du milieu complet etensemencées dans des flasques de 25 cm². A confluence, après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées par du PBS. Elles sont ensuite décollées selon le même protocole que les cellules COS-1 mais en utilisant leur milieu de culture complet, et une vitesse de centrifugation moindre de 200 x g.

2.3.2.2. Induction *in vitro* de la réponse inflammatoire.

La réponse inflammatoire a été induite sur les cellules épithéliales de glande mammaire par différentes cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α . De plus, une cinétique d'induction de cette réponse inflammatoire a été réalisée. L'utilisation de ces 3 cytokines, d'un témoin non induit, et la réalisation d'analyses génomiques et protéiques à 5 points de temps (6h, 12h, 18h, 24h et 48h) ont nécessité la préparation de 40 flasques de 25 cm² (Figure 52).

L'induction de la réponse inflammatoire s'effectue lorsque les cellules sont à confluence (environ 3.10⁶ cellules) en ajoutant dans le milieu de culture de l'interleukine afin d'obtenir une concentration finale de 15 ng/ml par boîte. Après chaque temps de cinétique, les cellules sont traitées à la trypsine, lavées 2 fois au PBS et directement congelées à -80°C.

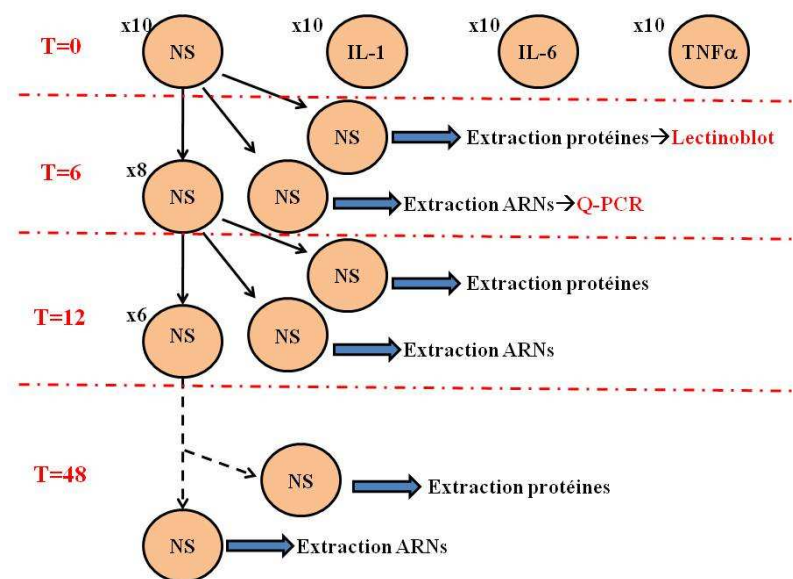


Figure 52 : Représentation schématique du protocole d'analyse de la réponse inflammatoire dans les cellules de glandes mammaires bovines en culture primaire. La démarche expérimentale est expliquée avec les cellules non-stimulées par les cytokines (NS) mais est identique avec les cellules stimulées par l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α . Les temps indiqués en rouge sont exprimés en heures.

2.3.3. Culture bactérienne

La souche bactérienne utilisée est *Escherichia coli* DH5 α . Les cultures bactériennes s'effectuent dans le milieu de culture liquide LB (Luria Bertani) composé de NaCl 1% (p/v), d'extrait de levure 0,5%

(p/v) et de bactotryptone 1% (p/v). La culture sur boîte est effectuée sur un milieu solide correspondant au LB supplémenté par de l'agar à raison de 1,5% (p/v).

2.3.3.1. Préparation de bactéries compétentes

Les cellules d'*E.coli* ne sont pas naturellement transformables. Afin de pouvoir faire pénétrer à l'intérieur de la cellule un ADN double brin, il faut la rendre compétente. La méthode utilisée est celle de Mandel et Higa (1970). Pour cela, 500 ml de culture sontensemencés à partir d'une préculture en phase stationnaire. Quand la turbidité de la suspension atteint 0,6 unités de DO à 600 nm, les cellules bactériennes sont récoltées par 5 min de centrifugation à 5000g. le culot cellulaire est resuspendu dans 250 ml de CaCl₂ 100 mM froid. La suspension est alors laissée 20 min en incubation dans la glace avant d'être centrifugée 5 min à 5000g. le culot est ensuite repris dans 20 ml de CaCl₂ 100 mM, 15% glycérol (v/v) (Crouse *et al.*, 1983). Les cellules sont ensuite laissées 24 heures à 4°C. Les cellules rendues compétentes sont alors fractionnées en tube de 20 µl puis congelées à -80°C.

2.3.3.2. Transformation des cellules compétentes

Toutes les constructions plasmidiques, qu'elles soient destinées au séquençage ou à l'expression de protéines recombinantes ont été amplifiées par des bactéries après transformation. La transformation est réalisée avec une quantité d'ADN allant de 50 à 100 ng qui doit être contenue dans un volume ne devant pas excéder 20 µl. Cet ADN est ajouté à 200 µl de bactéries compétentes décongelées lentement dans la glace. Après 30 min d'incubation dans la glace, le mélange est placé de 45 sec à 1 min dans un bain marie à 42°C puis 3 min dans la glace. Après ajout de 300 µl de milieu SOC (Tryptone 2% (p/v), NaCl 1% (p/v), d'extrait de levure 0,5% (p/v), KCl 250 mM 1% (v/v)), les bactéries sont incubées 1h à 37°C sous agitation (250 tours/min). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu solide.

2.4. Analyses biochimiques

2.4.1. Migration des protéines en gel de poly-acrylamide

Les électrophorèses des protéines sont réalisées en conditions dénaturantes. La dénaturation des protéines est effectuée par chauffage des échantillons pendant 5 min à 100°C dans le tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4% (v/v), glycérol 20% (v/v), β -mercaptoéthanol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0,02% (v/v). Le gel de séparation a une concentration en acrylamide et bis-acrylamide de 10% alors que celle du gel de concentration est de 4%. Une quantité de 40 μ g de protéine est soumise à la migration électrophorétique qui s'effectue à ampérage constant de 25 mA dans un tampon de migration Tris-Glycine.

2.4.2. Transfert sur membrane

Suite à la migration en gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF. Le transfert est dit « semi-sec » et est effectué dans un tampon Tris-glycine contenant 10% de méthanol (v/v). Il dure 45 min sous un ampérage constant de 200 mA. Le bon fonctionnement du transfert est vérifié au rouge ponceau. Après vérification, la membrane est mise à saturer sous agitation dans une solution de saturation, 2 heures à température ambiante ou à 4°C sur la nuit.

2.4.3. Lectinoblot et révélation

Après la période de saturation, la membrane est lavée par deux lavages successifs de 10 min dans du TBS (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M ; pH 7,5). Ces deux lavages sont suivis par un troisième d'une durée de 10 min dans le tampon dit Tampon 1 composé de : Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM ; pH 7,5.

Cette série de lavages se poursuit par une incubation de 2h avec les lectines issues du kit DIG glycan differentiation kit de Roche. Pour la MAA, 50 μ l de solution de lectine sont dilués dans 10 ml de Tampon 1 ; pour la SNA, 10 μ l de solution lectinique sont dilués dans 10 ml de Tampon 1.

L'incubation terminée, une nouvelle série de 3 lavages de 10 min au TBS est effectuée. Elle se poursuit par une incubation de 2h avec une solution d'anticorps secondaire Anti-DIG. Cette solution provient de la dilution de 10 µl d'anticorps secondaire, présent dans le kit dans 10 ml du Tampon 1. Une dernière série de trois lavages de 10 min dans le TBS est alors effectuée. La révélation du lectinoblot est alors réalisée en appliquant une solution de révélation qui se compose de 100 µl de « NBT/X-Phosphate solution » présente dans le kit dilués dans 5 ml de Tampon 2 constitué de Tris-HCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M, NaCl 0,1 M ; pH 9,5. La réaction de révélation est stoppée par rinçage à l'eau distillée et la membrane est séchée entre 2 feuilles de papier Whatman.

2.4.4. Activité enzymatique des glycosyltransférases

Pour les sialyltransférases, les essais enzymatiques se sont déroulés dans un volume final de 60 µl. Le tampon se compose de cacodylate de sodium 0,1 M ; pH 6,2, 10 mM MnCl₂, 0,2% Triton CF-54 (v/v), 50 µM CMP-[¹⁴C]Neu5Ac (243 mCi/mmol). Le substrat accepteur est soit un arylglycoside à une concentration finale de 1 mM soit une glycoprotéine à une concentration finale de 2 mg/ml. La source enzymatique utilisée correspond à 30 µg d'extraits protéiques de cellules COS-1 transfectées avec les formes membranaires des enzymes ou 25 µl de milieu de culture des cellules transfectées avec les formes solubles des enzymes. La réaction enzymatique s'effectue à 37°C pour une durée de 2 heures.

Concernant les essais enzymatiques avec les fucosyltransférases, le tampon de réaction se compose de 25 mM de cacodylate de sodium ; pH 6,5, d'ATP 5 mM, MnCl₂ 20 mM, 10 mM α-L-Fucose, 3 µM GDP-[¹⁴C]fucose (310 mCi/mmol). Les essais enzymatiques se sont déroulés en présence de 1 mM d'arylglycoside en utilisant comme source enzymatique 25 µg d'extraits protéiques de cellules COS-1 transfectées par le plasmide renfermant la séquence codante de l'enzyme. Ces tests d'activités ont été réalisés à 37°C sur une durée de 1h.

Pour les arylglycosides, la réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout de 3 ml d'eau. Les produits de la réaction sont ensuite purifiés par chromatographie hydrophobe sur des colonnes C18 SepPak cartridges (Millipore Corp., USA). Après lavage avec 15 ml d'eau, l'élution des arylglycosides est réalisée à l'aide de 10 ml de méthanol directement dans des fioles de comptage en présence d'un volume de 10 ml de liquide scintillant Instagel (Packard, IL).

Pour la purification des glycoprotéines, la réaction enzymatique est stoppée par 1 ml d'eau contenant 5% d'acide phosphotungstique (p/v). Les protéines sont alors récoltées sur des filtres en fibre de verre (Whatman GF/A glass fiber filters). Elles sont ensuite lavées 4 fois par 1 ml d'acide phosphotungstique 5% (p/v), 1 lavage par 1 ml d'acide trichloroacétique 5% (p/v) et un dernier avec 1 ml d'éthanol. Les filtres sont alors séchés à l'étuve à 37°C puis insérés dans des fioles de comptage avec 10 ml de liquide scintillant Instagel (Packard, IL). Que ce soit pour les arylglycosides ou les glycoprotéines, les fioles ont été comptés dans un compteur à scintillations beta (TRI-CARB 2100 TR, Packard, IL).

2.4.5. Purification des oligosaccharides du lait

2.4.5.1. Préparation des échantillons de lait.

Les différents échantillons de 250 ml de lait de brebis ont été conservés dans un volume équivalent d'éthanol absolu. Ces échantillons de lait ont ensuite été repris dans 500 ml d'un mélange H₂O/Ethanol en proportions 1/1. La fraction oligosaccharidique est contenue dans le surnageant obtenu après 20 min de centrifugation à 11000 x g. Le volume de la solution oligosaccharidique est alors réduit à un volume n'excédant pas 10 ml par l'utilisation d'un rotavapeur (Buchi, Suisse).

2.4.5.2. Chromatographie échangeuse d'anions

La construction de la colonne de chromatographie (Ø 2 cm × 50 cm) a été réalisée avec un gel Dowex 50x2. La régénération du gel 50x2 s'effectue en deux étapes. Le gel placé dans un fritté est dans un premier temps rincé par 2 litres d'H₂O. Le gel est ensuite nettoyé par l'ajout de 2x1L de NaOH 3 M. Une fois la soude filtrée, le gel est de nouveau rincé par de l'eau jusqu'à ce que le pH en sortie de filtration soit ramené à neutralité. Enfin, l'activation du gel est réalisée par l'ajout d'un litre HCl 4 M puis rincé par de l'eau jusqu'à l'obtention de pH7 en sortie de filtration. Le gel régénéré est alors réhydraté et coulé dans une colonne. La fraction d'échantillon à déposer ne doit pas excéder 1 ml et l'élution est effectuée avec de l'eau. Le temps d'élution par tube est fixé à 2 minutes. Cette colonne a pour but de séparer les oligosaccharides libres des glycopeptides résiduels. Après analyse, sur plaque de silice, les fractions d'intérêt sont ensuite regroupées et le pH est ramené à la neutralité pour éviter la perte des acides sialiques.

2.4.5.3. Chromatographie gel-filtration

La séparation du lactose des autres oligosaccharides a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique sur colonnes de gels de polyacrylamide (BioGel P-4 800-4000 Da ; Biorad France ; colonne : Ø 5 cm × 120 cm) équilibrés dans le système d'élution (H₂O) sous un débit constant de 10 mL.h⁻¹ assuré par une pompe péristaltique. Le volume de l'échantillon déposé ne doit pas excéder 2 ml le temps d'élution pour chaque fraction est de 20 minutes.

2.4.5.4. Chromatographie échangeuse de cations

Cette chromatographie a été réalisée dans le but de séparer les oligosaccharides neutres des oligosaccharides acides du lait de brebis. La colonne (Ø 2 cm × 50 cm) a été montée avec un gel Dowex 1x2. Le gel est régénéré selon le même procédé que la colonne 50x2, c'est-à-dire avec du NaOH 3 M. Par contre l'activation du gel se fera à l'aide d'acide formique pur à la place de l'HCl. Après montage de la colonne, il est nécessaire de la laisser couler à vide avec de l'eau durant une heure avant de déposer l'échantillon. L'échantillon, qui doit être contenu dans un volume inférieur à 1 ml, est ensuite élué une première fois par de l'eau puis analysé sur plaque de silice. Une seconde élution de l'échantillon est ensuite réalisée avec de l'acétate de pyridine 500 mM. Les fractions d'intérêt issues de cette seconde élution sont regroupées et le pH est ramener à la neutralité. Que ce soit pour la première ou la seconde élution, le temps d'élution est fixé à 4 min par fraction.

2.4.5.5. Chromatographie couche mince

Les échantillons obtenus en sortie de colonne ont soit été analysés par dépôt direct de 2 à 6 µl de chacune des fractions sur plaque de silice soit après migration en chromatographie couche mince de 5 à 10 µl des fractions d'intérêt. La migration en couche mince des oligosaccharides est réalisée dans une cuve en verre contenant un tampon de migration Butanol/Acide acétique/eau dans les proportions 2/1/1,5. Après la migration, la plaque de silice est séchée. La présence des oligosaccharides est détectée par cuisson de la plaque après vaporisation d'H₂SO₄ 20 % à 0,1 % d'orcinol dans une étuve à 120°C. Les fractions d'intérêt ont alors été lyophilisées.

2.4.5.6. Perméthylation des oligosaccharides.

Certaines fractions oligosaccharidiques ont été perméthylées avant d'être analysées par spectrométrie de masse. Cette perméthylation consiste à l'ajout de groupement méthyles sur les fonctions hydroxyles libres des oligosaccharides. Les oligosaccharides lyophilisés sont repris dans 400 µl de DMSO en présence d' ICH_3 . Après une heure d'incubation dans un bain à sonication, les oligosaccharides perméthylés sont récupérés dans la phase aqueuse d'une extraction au chloroforme.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. *bST6Gal II*, un gène codant une seconde β -Galactoside α 2,6 sialyltransférase bovine, ST6Gal II, impliquée au cours de la réponse inflammatoire

La sialylation en α 2,6 d'une lactosamine est réalisée par la famille des β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases. Longtemps, cette sous famille de glycosyltransférase n'était composée que d'un seul membre, ST6Gal I, jusqu'à la découverte il y a quelques années d'un nouveau gène et de son produit chez l'homme (Takashima *et al.*, 2002 ; Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003) et la souris (Takashima *et al.*, 2003), ST6Gal II. Ces quelques études suggèrent un rôle spécifique de cette enzyme sans pour autant avoir pu l'identifier clairement. Récemment, Groux-Degroote *et al.* (2008) ont montré une surexpression du gène *ST6Gal II* dans des cellules de muqueuse bronchique humaine stimulées par les interleukines IL-6 et IL-8. Ces différentes études ainsi que les revues de Gagneux et Varki (1999 et 2003) nous ont laissé penser que *ST6Gal II* pouvait potentiellement être impliqué au cours de la réponse inflammatoire.

L'enzyme étant inconnue chez notre espèce d'étude, *Bos taurus*, il a donc fallu commencer par déterminer quelle était la séquence codante du gène *bST6Gal II*, caractériser son organisation génomique, et en identifier les différents transcrits. Nous avons ainsi trouvé un gène s'étalant sur plus de 50 kpb incluant 5 exons codants et 1 non codant. L'analyse de l'expression tissulaire de ce gène dans les 10 tissus bovins différents que nous avons étudiés nous a révélé la présence de trois variants transcriptionnels répartis de manière tissu spécifique. L'étape suivante a consisté à la caractérisation fonctionnelle du gène par la production de protéines recombinantes en système d'expression hétérologue (cellules COS-1). Nos résultats ont montré que cette enzyme possède une faible activité sur l'asialo- α 1-glycoprotéine et une plus forte activité catalytique sur les oligosaccharides libres, ces derniers ayant tous une structure de base de type II.

Ensuite, afin de tester nos hypothèses sur l'implication du produit de ce gène au cours de la réponse inflammatoire, nous avons créé un modèle *in vitro* à l'aide de cellules épithéliales de glande mammaire en cultures primaires. Les cellules ont été stimulées par des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1, IL-6 et le TNF α . Nos résultats révèlent que le gène est surexprimé après une stimulation par l'IL-6 sans pour autant induire de changement au niveau du profil de sialylation des glycoprotéines de surface.

1.1. Clonage moléculaire d'un ADNc codant pour *bST6Gal II* et organisation génique

1.1.1. Clonage moléculaire d'un ADNc de *bST6Gal II*

Lorsque ce travail a débuté, le programme de séquençage du génome bovin venait de commencer et nous ne disposions d'aucune information concernant ce gène. Nous avons donc entrepris le clonage de *bST6Gal II*. Dans ce but, nous avons utilisé les séquences des ARNm des gènes *ST6Gal II* humain (AB058780) et murin (NM_172829) afin d'identifier dans les différentes banques de données bovines, qu'elles soient génomique ou d'expression, des séquences présentant de fortes homologies et pouvant correspondre au gène orthologue de *hST6Gal II* et *mST6Gal II*. Cette approche nous a permis d'identifier 5 WGS, aujourd'hui réunis dans un seul et unique contig WGS (AAFC 03085877.1; Matériels et méthodes), dont les séquences recouvrent la totalité de la région codante. A partir de cette séquence putative, nous avons déterminé un couple d'amorces oligonucléotidiques (Tableau IV ; Matériel et méthodes) grâce auquel nous avons amplifié par PCR, à partir d'ADNc de cerveau et de glande mammaire, un fragment d'environ 1,5 kpb. Nous avons ensuite introduit les amplicons obtenus dans un vecteur d'amplification et nous les avons séquencés. Ces fragments de 1510 pb provenant de deux types de tissus différents se sont avérés identiques. La séquence inclut un codon d'initiation et un codon de terminaison de la traduction nous laissant penser que nous avons isolé une région codante entière. De plus, notre amplicon présente 75% d'identité avec la séquence humaine et 71% avec la séquence murine, ces taux nous suggérant très fortement que nous avons bel et bien amplifié le cadre ouvert de lecture de l'orthologue bovin aux séquences humaine et murine de *ST6Gal II*.

1.1.2. Structure du gène *ST6Gal II* et de son produit

Après avoir isolé ces ADNc, nous avons voulu déterminer quelle était la structure du gène dont ils étaient issus. Pour ce faire, nous avons utilisé notre séquence afin d'effectuer une nouvelle analyse BLAST des banques de données d'ADN génomique bovin du NCBI et de *Ensembl*. Les résultats obtenus montrent que le WGS sur lequel est retrouvé le gène *bST6Gal II* est associé au chromosome BTA11 et se positionne sur le brin sens (+) entre les bases 47257027 et 47312647.

1.1.2.1. Le cadre ouvert de lecture

La représentation schématique de *ST6Gal II* de la Figure 1A montre que le cadre ouvert de lecture du gène se répartit sur 5 exons (E1 à E5) dont deux, E1 et E5, ont la particularité d'englober des séquences codantes et non codantes. En effet, la séquence d'E1 se constitue de 476 paires de bases 5' non traduites en amont du codon d'initiation de la traduction et présente les 858 premières paires de bases du cadre de lecture (Figure 53A). A l'inverse, E5 comprend les 254 dernières bases de la région codante et se prolonge après le codon STOP par une séquence 3' non traduite d'environ 1 kpb (Figure 53A). De plus, une observation plus minutieuse de la séquence de cet exon E5 nous laisse penser qu'il porte la totalité de la région 3' non traduite de l'ARNm. Nous avons pu en effet mettre en évidence la présence d'un site de polyadénylation (AATAAA) situé 1053 paires de bases en aval du TGA. Pour compléter cette description, remarquons que les tailles des exons E2 à E4 sont relativement petites avec des longueurs respectives de 99, 102 et 175 paires de bases, ce qui amène le cadre ouvert de lecture à 1488 paires de bases (Figure 53A).

1.1.2.2. Les structures introniques

Nous avons ensuite voulu vérifier *in vitro* le découpage exon/intron de *bST6Gal II*. Dans cette optique nous avons réalisé une amplification des séquences introniques par PCR. Chaque intron a été amplifié avec des amorces situées sur les exons bordant les séquences d'intérêt (Figure 53A). Comme nous pouvons l'observer sur le gel d'électrophorèse de la Figure 53B, nous avons obtenu

des fragments situés aux alentours de 6,5 kpb, 1,4 kpb et 4,4 kpb, ces tailles correspondant approximativement à celles prévues *in silico* pour les introns 1, 2 et 3. Du fait de leur taille plutôt importante, nous avons choisi d'insérer chaque amplicon dans un vecteur plasmidique afin de nous faciliter l'étape de séquençage. Nous avons ainsi pu contrôler le découpage exon/intron de *bST6Gal II* en nous attachant particulièrement à vérifier la présence des sites consensus d'épissage (Figure 53B). Le seul intron pour lequel nous n'avons pas pu obtenir d'information de manière expérimentale est l'intron I4. Aucune des conditions PCR que nous avons utilisé ne nous a permis de l'amplifier et sa taille putative pourrait expliquer les difficultés que nous avons rencontrées. En effet, d'après les informations que nous avons pu recueillir dans les banques de données du NCBI, I4 mesurerait de 12298 pb (Figure 53A).

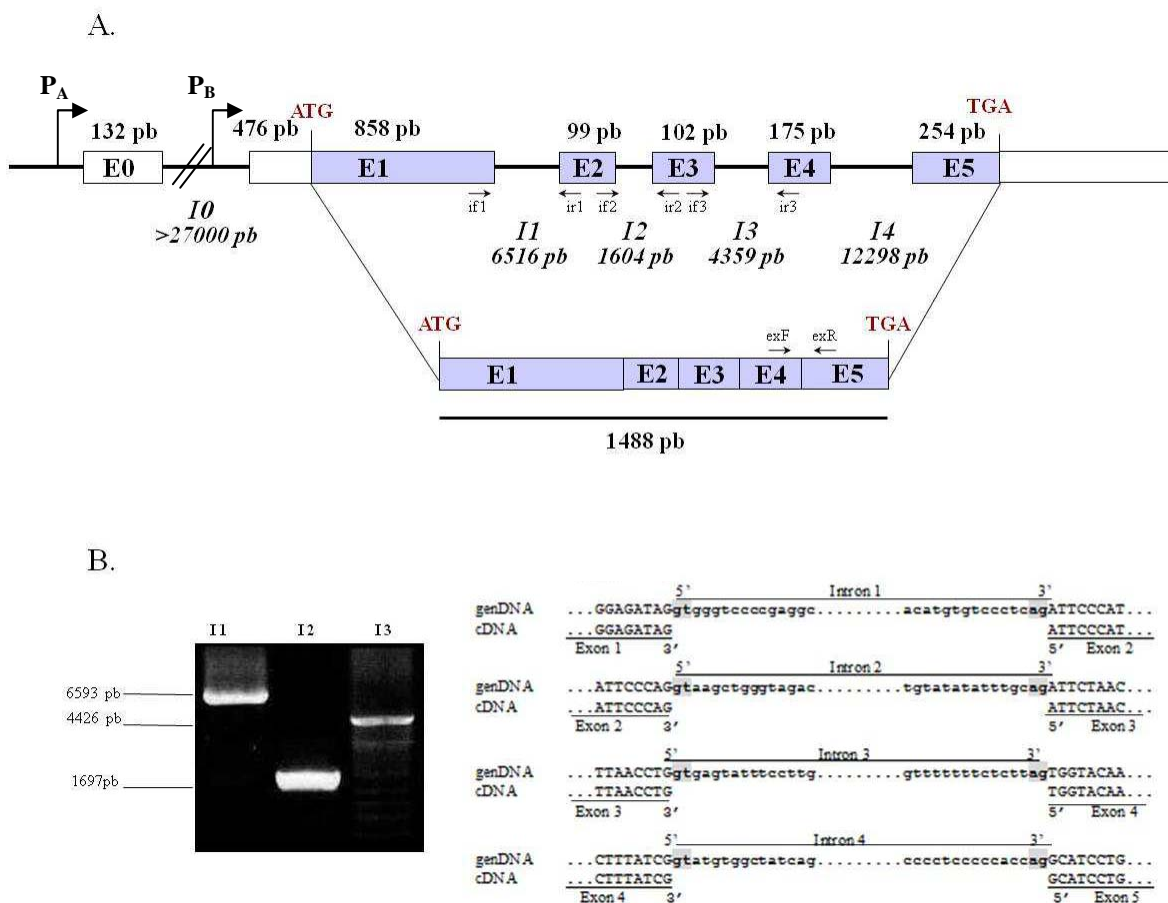


Figure 53: Organisation génique de *ST6Gal II* bovin : (A) Représentation non à l'échelle du gène *ST6Gal II* avec ses 6 exons (E0 to E5) et ses 5 introns (I0 à I4). En dessous est représenté l'ARNm résultant. La taille des introns et des exons est exprimée en pb. Les rectangles blancs indiquent les séquences exoniques non traduites, les rectangles bleus les séquences traduites et les introns sont représentés par un trait. P_A et P_B correspondent aux deux régions promotrices putatives de *ST6Gal II*. En (B), partie gauche de la figure, gel d'électrophorèse montrant l'amplification par PCR à l'aide des paires d'amorces 3, 4, et 5 (Tableau 1, Matériel et méthodes) des régions introniques I1, I2 et I3. Les amorces ont également été positionnées au niveau de la représentation schématique du gène. La partie droite de la figure donne les séquences partielles des régions introniques et des extrémités exoniques amplifiées par PCR. Les alignements représentent les séquences de jonctions exon/intron ainsi que les séquences consensus d'épissage qui apparaissent en gras. L'intron I4 n'ayant pu être amplifié, la séquence de jonction et les sites consensus d'épissage ont été déduits des banques de données d'ADN génomique bovin à partir d'une analyse *in silico*.

1.1.2.3. Analyse comparative de la structure de *bST6Gal II* par rapport à celles de *bST6Gal I* et *hST6Gal II*

Bien que nos résultats expérimentaux ne confirment pas la présence de l'intron I4, le découpage de la région codante de *bST6Gal II* en 5 exons séparés les uns des autres par 4 introns apparaît évidente. En effet, cette organisation du cadre ouvert de lecture est communément retrouvée pour les gènes orthologues de *bST6Gal II* dont le gène humain.

Une analyse comparative des structures génomiques humaine et bovine rend compte de fortes similitudes entre ces deux espèces. En premier lieu, la taille des exons codants est très bien conservée, à l'exception de l'exon 1 qui apparaît plus court de 141 paires de bases dans la séquence bovine (Figure 54A et B). En outre, les introns humains et bovins ont des tailles qui diffèrent plus largement. Il est tout de même possible d'identifier certaines ressemblances entre les structures de ces deux gènes orthologues en observant de manière globale les distances séparant les exons les uns des autres.

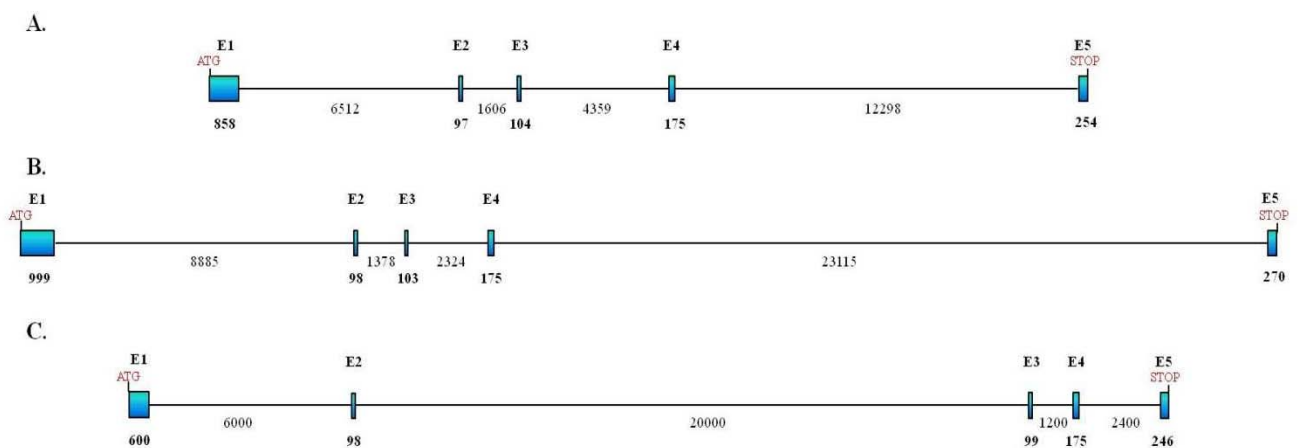


Figure 54 : Comparaison des organisations géniques des régions codantes de *bST6Gal II* (A), *hST6Gal II* (B) et *bST6Gal I* (C). Les exons sont représentés par des rectangles bleus et leur taille exprimée en paires de bases est précisée au dessus. Les introns sont représentés par des traits et leur taille indiquée en dessous.

En effet, en comparant les longueurs des introns d'un même gène les unes par rapport aux autres, il s'avère que la situation entre l'homme et le bovin est identique, à savoir des introns 2 et 3 de tailles

relativement modestes alors que celles des introns 1 et 4 sont plus importantes (Figure 54A et B). Enfin, notons que pour ces deux espèces, le classement des introns en fonction de leur taille est commun, avec dans un ordre croissant I2, I3, I1 et I4.

Il existe également de fortes similitudes structurales entre les deux gènes bovins de la famille des β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases. Tout d'abord, la partie codante de *bST6Gal I* présente un découpage exon/intron similaire à celui de *bST6Gal II*, à savoir la présence de 5 exons codants séparés les uns des autres par 4 introns (Figure 54A et C). Cependant, la ressemblance ne s'arrête pas là. Ces différents exons codants ont des tailles très similaires, avec la même différence que nous avons pu observée pour *hST6Gal II* vis-à-vis de l'exon 1. Mais alors qu'il était plus petit que celui de la forme humaine, l'exon 1 de *bST6Gal II* est plus long de 258 paires de bases que celui de *bST6Gal I*. Par contre, il n'est pas possible de comparer les structures introniques de ces deux gènes qui présentent de trop grandes différences (Figure 54A et C).

Enfin, la comparaison des séquences exoniques de ces 2 gènes bovins révèle des taux d'identité de séquences de l'ordre de 60% pour les exons 2, 3, 4 et 5 et de 40% pour l'exon 1 (Tableau VI). Sur la totalité de la séquence codante, ce pourcentage d'identité est de 50,5% ce qui est largement inférieur à celui observé de 75% entre *bST6Gal II* et *hST6Gal II*. La très forte ressemblance entre les séquences humaine et bovine s'observe majoritairement au niveau des exons 2, 3 et 4 qui codent pour le domaine catalytique (Tableau VI).

Tableau VI : Comparaison des séquences exoniques codantes de *bST6Gal II* avec celles de *bST6Gal I* et *hST6Gal II*

Exon	<i>bST6Gal II</i>		<i>bST6Gal I</i>		% d'identité nucléotidique	
	Taille des exons (pb)	Acides aminés codés	Taille des exons (pb)	Acides aminés codés	<i>bST6Gal II</i> / <i>bST6Gal I</i>	<i>bST6Gal II</i> / <i>hST6Gal II</i>
1	858*	286	600*	200	41,6**	64,1
2	97	32	98	33	58,4	81,9
3	104	35	99	33	57,3	78,9
4	175	58	175	58	64,1	75
5	254*	85	246*	82	63,4**	65

*représentent les bases codantes des exons E1 et E2. **seules sont prises en compte les parties codantes des exons

1.1.2.4. La protéine bST6Gal II

Le cadre ouvert de lecture de 1488 pb du gène *ST6Gal II* code pour une protéine de 495 acides aminés. Le profil d'hydropathie de la structure primaire de cette protéine indique qu'il n'y a qu'une seule région particulièrement hydrophobe (Figure 55), celle-ci correspondant à un domaine transmembranaire. Ainsi, l'enzyme bovine ST6Gal II adopte la structure générale des sialyltransférases, à savoir celle d'une protéine transmembranaire de type II. Cette protéine est constituée d'une courte région cytosolique de 11 acides aminés, d'une unique région transmembranaire de 19 acides aminés, cette dernière étant prolongée dans la lumière de l'appareil de Golgi par une région tige et un domaine C-terminal catalytique de 465 acides aminés.

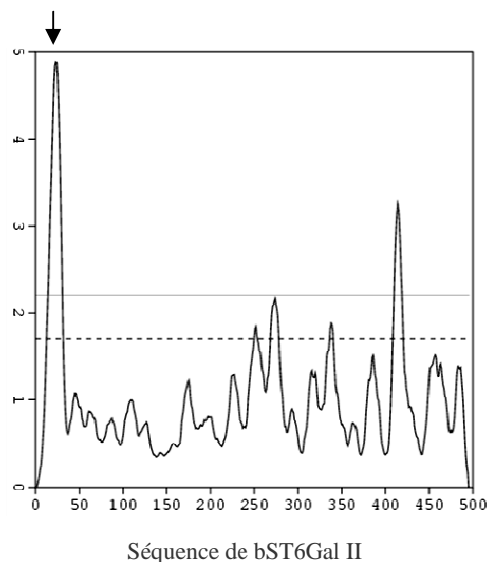


Figure 55 : Profil d'hydropathie de la ST6Gal II bovine. La flèche indique un pic d'hydrophobie qui correspond au domaine transmembranaire de la protéine.

L'alignement de la séquence de bST6Gal II avec celles de ses homologues humaine, murine et de rat (Figure 56), permet de constater que ces sialyltransférases se ressemblent beaucoup, la protéine bovine présentant 66% d'identité avec les protéines de souris et de rat et partage 67,4% de ses acides aminés avec la forme humaine. De manière générale, la protéine bovine est plus courte que les trois autres, la différence étant due à la longueur de la région tige, région la moins bien conservée entre les séquences de ces quatre espèces (Figure 56). Le domaine catalytique est en outre particulièrement bien conservé et les sialylmotifs I (Large), II (Small), III et IV (Very Small),

impliqués dans la reconnaissance des substrats donneurs et accepteurs ou dans le mécanisme catalytique, sont parfaitement identifiables au niveau de la séquence bovine (Figure 56).

ST6Gal II souris	MKPHLKQWRQRMFLGIFVWGLLFLAIFIIYFTNSNPAAMPSSFSFLESRGLLPLQKQRV	60
ST6Gal II rat	MKPHLKQWRQRMFLAIFVWGLLFLAIFIIYFTNSNPAAMPSSFSFLESRGLLPLVQKQRV	60
ST6Gal II humain	MKPHLKQWRQRMFLGIFAWGLLFLIFIIYFTNSNPAEPVSSLSFLETRRLLPVQKQRA	60
ST6Gal II bovin	MKPHLKQWRQ <u>GMLCGVFAWGLFFVVI</u> FLYFTDSSPAKPAPSSFSFLETRRLLPAQGRQRA	60
	***** * . : * . * * : * : * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * .	
ST6Gal II souris	IMGALQEPSLPRSLDASKVLLDHPENPFHPWPGDPQKWDQAPNGFDNGDEFFTSQVGRK	120
ST6Gal II rat	IMGALQEPSLPRSLPEPSKVLMDGHSASPFNWPGDPQKGDQAQDGFNDGDEFFTSQVGRK	120
ST6Gal II humain	IMGAAHEPSPPPGGLDARQALPRAHPAGSFHAGPGDLQKWAQSQDGFH-KEFFSSQVGRK	119
ST6Gal II bovin	IMGASEG -- LPEGADLR RRGSPRGLPSGLR TWAG ----- DGFEREQ EFLSVQTGR	109
	**** . * . : : * : * : . * * : * . * .	
ST6Gal II souris	SQSAFYPEEDSYFFVADQPELYHHRQGALELPSGET-----SWRSGVPQPKQ-KLLHPR	174
ST6Gal II rat	SQSAFYPEEDNYFFVAGQPGLYHHRQGALELPSGES-----SWQSGPQPKQEKLRHPR	175
ST6Gal II humain	SQSAFYPEDDDYFFAAGQPGWHSHTQGTLGFPSPGEPGREGAFPAQVQRRRVKRRHR	179
ST6Gal II bovin	SLSSFAPEDS ----- APG ----- TSGRLFP GDGPPE ----- GARPPRAAPGRRAKRGPR	153
	* * : * * * : . *	
ST6Gal II souris	--RGSLEPEEAYDSMDLSASMSRAFLYRLWKGVSSKMLNPRLQKAMRYMSFNKHGVRFR	232
ST6Gal II rat	--RGSLEPEEAYDSMDLSTMSRAFLYRLWKGTVSSKMLNPRLQKAMRYMSFNKHGVRFS	233
ST6Gal II humain	QRRSHVLEEGDDGDRLYSSMSRAFLYRLWKGNVSSKMLNPRLQKAMKDYLTANKHGVRFR	239
ST6Gal II bovin	-- RQSL SARGEDGERLYSSMRALLRRLWKGDASARMLHPR LQKAMGAYLRANKHGVRFR	211
	* : . . * . : * : *	
ST6Gal II souris	RRGRREATRTGPELLCEMRRRVVRTLDGREAPFSGLGWRPLVPGVPLSQLHPRGLSS	292
ST6Gal II rat	RRGRREARTGPELLCEMRKRVVRTLDGKEAPFSGLGWRPLVPGVPLSQLHPRGLRS	293
ST6Gal II humain	--GKREAGLSRAQLLCLRSRARVRTLDGTEAPFSGLGWRRLVPAVPLSQLHPRGLRS	297
ST6Gal II bovin	-- GRRASGRSRTELLCALRGRVQVRTLDGTEPPF SALGWRALVPPVPLSRLPRRLR LCA	269
	* : * : . . * * : * * . *	
ST6Gal II souris	VVMSAGAIL N SSLGEEIDSHDAVLRFN SAPTRGYEKDVG N KTTVRIINSQ ILANPSHHFI	352
ST6Gal II rat	VVMSAGAIL N SSLGEEIDSHDAVLRFN SAPTRGYEKDVG N KTTVRIINSQ ILANPSHHFI	353
ST6Gal II humain	VVMSAGAIL N SSLGEEIDSHDAVLRFN SAPTRGYEKDVG N KTTIRIINSQ ILTNPSSHHFI	357
ST6Gal II bovin	VVTSAGAIL N SSLGEEIDSHDAVLRFN SAPTRGYEKDVG N KTTVRIINSQ ILTNPSSYHFM	329
	** *	
ST6Gal II souris	DSALYKDVILVA WDPAPYSANLNLWYK KPDYNLF TPYIQHRRKYPTQPFYILHPKFIWQL	412
ST6Gal II rat	DSSLYKDVILVA WDPAPYSANLNLWYK KPDYNLF TPYIQHRLKYPTQPFYILHPKFIWQL	413
ST6Gal II humain	DSSLYKDVILVA WDPAPYSANLNLWYK KPDYNLF TPYIQHRQNPQPFYILHPKFIWQL	417
ST6Gal II bovin	DSALYKDVILVA WDPAPYSANLNLWYK KPDYNLF TPYVQHRQNPQPFYILHPKFIWQL	389
	** . *	
ST6Gal II souris	WDIIQENTREKIQPN PSSGFIGILIMMSCKEVH VYEYIP SVRQTELCHYHELYDA AC	472
ST6Gal II rat	WDIIQENTREKIQPN PSSGFIGILVMSMCQEVH VYEYIP SVRQTELCHYHELYDA AC	473
ST6Gal II humain	WDIIQENTKEKIQPN PSSGFIGILIMMSCREVH VYEYIP SVRQTELCHYHELYDA AC	477
ST6Gal II bovin	WDIIQENTKEKIQPN PSSGFIGILLMNL CGEVH VYEV PSVRQTDLCHYHELYHDA AC	449
	***** . *	
ST6Gal II souris	TLGAYHPLL YE KLLVQRLNTGTQADLHHKGKVLPGFQTLRCPVTSNPNTHS	524
ST6Gal II rat	TLGAYHPLL YE KLLVQRLNTGTQADLHHKGKVLPGFQTLRCPVTRPNNTNT	525
ST6Gal II humain	TLGAYHPLL YE KLLVQRLNMGTTQADLHHRKGVLPGFQAVHCPAPSPVIPHS	529
ST6Gal II bovin	TLGAYHPLL YE KLLVQRLNVGTHGDLHRKGVLPGLQAVRCPP GA -----	495
	***** * * . *	

Figure 56 : Alignements des séquences protéiques putatives des ST6Gal II murine, de rat, humaine et bovine. Le domaine transmembranaire est souligné ; les sialylmotifs I, II, III et IV sont respectivement représentés en bleu, rouge, vert et orange, les 3 motifs spécifiques des β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases en gras italique violet ; les sites potentiels de N-glycosylation sont encadrés. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés et les points ceux homologues. Les traits sur fond gris représentent les délétions spécifiques à bST6Gal II.

De plus, nous avons pu retrouver les trois motifs spécifiques de la famille des β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases (Figure 56) récemment identifiés par Patel et Balaji (2006) et qui joueraient un rôle dans la spécification des substrats accepteurs de l'enzyme.

Enfin, notons qu'il existe deux sites potentiels de *N*-glycosylation aux positions 279 et 309 de la séquence primaire de la protéine bovine, ces 2 sites étant parfaitement conservés chez les trois autres espèces que nous avons étudiées (Figure 56).

1.2. Expression tissulaire du gène

Après avoir déterminé la structure du gène *bST6Gal II*, nous nous sommes ensuite intéressés à en déterminer son profil d'expression tissulaire. Dans cette optique et en raison du faible niveau d'expression des glycosyltransférases, nous avons choisi d'utiliser la RT-PCR en prenant le soin de choisir des amorces permettant l'amplification d'un fragment dont la séquence recouvre deux exons. Ainsi l'amorce sens est située au niveau de l'exon 4 alors que l'amorce anti sens se trouve dans l'exon 5. L'avantage d'amplifier un fragment situé à cheval sur 2 exons différents permet de se prémunir contre d'éventuelles contaminations de la préparation d'ADNc par de l'ADN génomique, et, comme nous l'avons vu précédemment, l'intron situé entre les exons E4 et E5 a une taille très importante. D'autre part, en choisissant le couple d'amorces au niveau des 2 derniers exons, nous avons l'avantage de limiter la perte de transcrits liée à une retro-transcription incomplète. Enfin, nous nous sommes assurés de la qualité de nos préparations d'ADNc en effectuant une PCR sur un gène de ménage, en l'occurrence sur l'ADNc codant la GAPDH.

Nos résultats montrent que contrairement au gène *bST6Gal I*, dont l'expression est ubiquitaire (Mercier *et al.*, 1999), *bST6Gal II* présente un profil d'expression tissulaire plus restreint. Parmi les tissus que nous avons testés, nous avons détecté la présence de transcrits de *bST6Gal II* au niveau du cerveau, des glandes salivaires, des poumons, de la rate, de la glande mammaire et du colon (Figure 57), sa présence n'ayant pas été mise en évidence au niveau du thymus, des testicules et du tissu adipeux. *bST6Gal II* apparaît fortement exprimé dans les poumons, il l'est à un niveau moindre dans le cerveau, la rate, le colon et faiblement dans les glandes salivaires et mammaires. Enfin, nous observons un très faible signal au niveau du muscle squelettique.

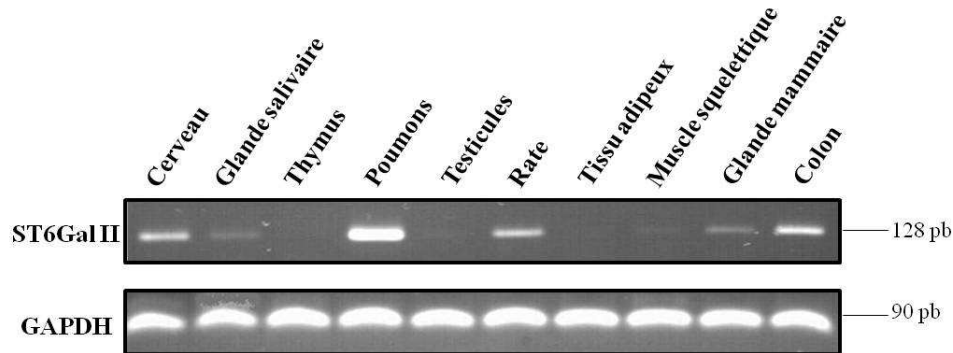


Figure 57 : Profil d'expression tissulaire du gène *bST6Gal II*. L'expression tissulaire du gène été explorée en utilisant la RT-PCR sur des ARN de 10 tissus bovins différents. Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique, l'amorce sens (*bGal2exF*) a été choisie dans l'exon 4 alors que l'amorce anti-sens a été choisie dans l'exon 5 (*bGal2exR*) (voir figure 1A). Le fragment amplifié est alors de 128 pb. L'amplification d'un fragment de 90 pb du gène de la GAPDH a servi de contrôle qualité de la préparation d'ADNc.

Comme il a été montré chez l'homme qu'il existait des transcrits présentant des délétions exoniques dans l'ORF (Takashima *et al.*, 2002), nous avons recherché dans les tissus bovins où le gène est présent l'expression de transcrits alternatifs pour la région codante. Pour ce faire, nous avons effectué une PCR avec un couple d'amorces qui permet d'amplifier un fragment recouvrant la totalité du cadre de lecture. Un seul fragment a pu être observé à l'issue de cette PCR, ceci laissant penser qu'il n'y a pas de réarrangement exonique du cadre ouvert de lecture lors de la transcription (Figure 58).

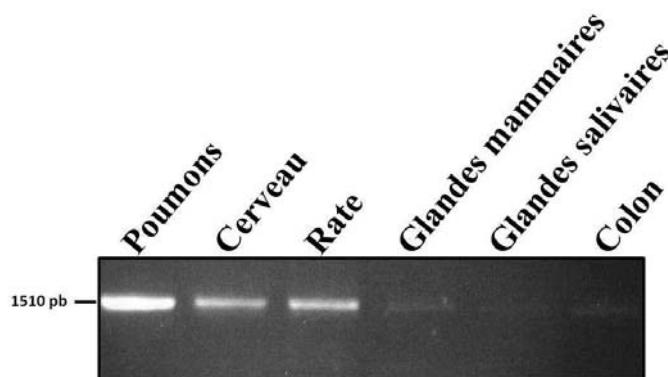


Figure 58 : Recherche de transcrits alternatifs dans la région codante de *ST6Gal II* durant la transcription. Amplification par PCR de la région codante de *ST6Gal II* à partir d'ADNc de différents tissus bovins. La taille du fragment amplifié est de 1510 paires de bases.

1.3. Analyse des régions 5' non traduites des ARNm de *bST6Gal II*. Organisation et distribution tissulaire

Le fait que *bST6Gal II* ne soit pas exprimé dans tous les tissus et que son niveau d'expression varie d'un tissu à l'autre nous laisse penser que sa transcription est soumise à une régulation fine. Dans le but d'enrichir nos connaissances sur la régulation transcriptionnelle de ce gène, nous avons cherché à identifier l'ensemble des séquences 5'-non traduites des transcrits de *bST6Gal II*.

Cette analyse a été réalisée par la technique de 5'RACE (voir le Matériel et méthodes) à partir des ADNc des différents tissus exprimant le gène et nous a permis de mettre en évidence 3 types de transcrits (Figure 59A). Le premier de ces trois messagers (transcrit b) n'a été retrouvé qu'au niveau du cerveau (Figure 59B) et présente une structure assez simple, sa région 5' non traduite étant uniquement composée des 476 bases situées en amont du site d'initiation de la traduction (Figure 59A) et qui constituent la totalité de la partie non codante de l'exon E1. Le deuxième variant transcriptionnel (transcrit a₁) est également spécifique du cerveau (Figure 59B) mais sa structure se révèle plus complexe. En effet, la partie 5' non traduite se compose des 46 bases situées en amont du point d'initiation de la traduction et des 132 bases de l'exon E0 (Figure 59A). Ce transcrit est le résultat de la maturation des ARNm par un épissage alternatif entre les exons E0 et E1, la distance séparant ces deux exons sur le BTA 11 ayant pu être évaluée *in silico* comme étant supérieure à 27000 paires de bases (Figure 53). Les sites donneurs (GT) et accepteurs (AG) d'épissage ont également pu être mis en évidence. Enfin, le troisième et dernier transcrit (a₂) que nous avons mis en évidence est retrouvé dans tous les types cellulaires testés et exprimant le gène (Figure 59B). Sa séquence est proche de celle du second à la seule différence des 107 premières paires de bases de l'exon E0 qui sont absentes dans ce troisième messenger (Figure 59A). Le +1 de la transcription se situe au niveau de la 108^{ème} base de E0.

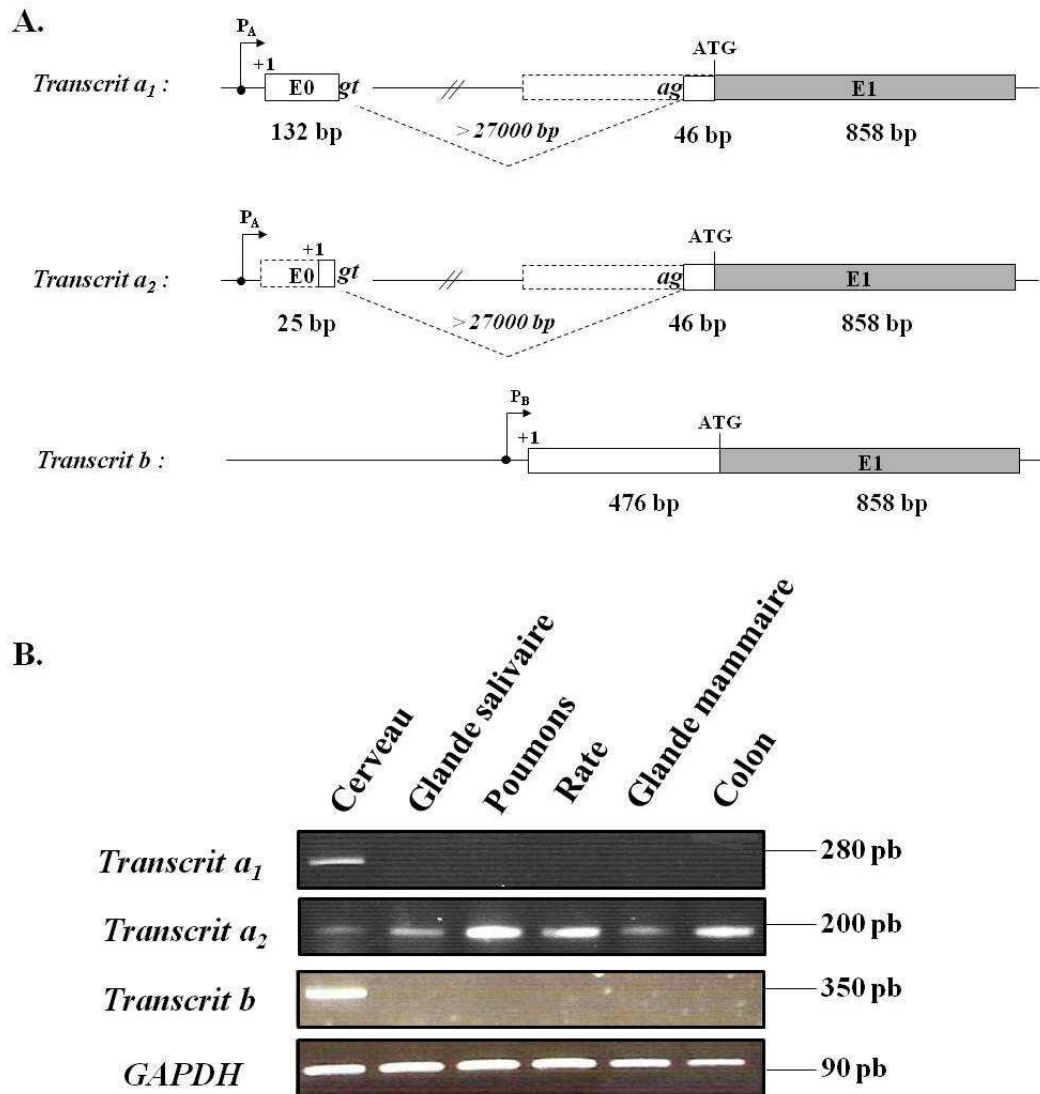


Figure 59 : Les différentes régions 5' non traduites des ARNm du gène *bST6Gal II*. Représentation schématique des différentes régions 5'UTR des transcrits (A) et analyse de leur profil d'expression tissulaire (B). Les transcrits ont été identifiés par 5'-RACE. En (A), les rectangles grisés correspondent à la région traduite de l'exon E1 alors que les séquences non traduites des exons E0 et E1 sont représentées par des rectangles vides. Les sites consensus d'épissage sont représentés en gras-italique. Les rectangles en pointillés correspondent aux séquences non transcrites des exons E0 et E1 dans les ARNm matures. La taille des différentes régions non traduites sont indiquées en paires de bases. P_A et P_B indiquent la localisation des régions promotrices potentielles de *bST6Gal II*. En (B), gel d'électrophorèse présentant le profil d'expression tissulaire de ces trois types de transcrits, la GAPDH a été utilisée comme contrôle de la retro-transcription.

Nous pouvons donc déduire de ces résultats que dans l'état actuel de nos connaissances il existerait deux familles de transcrits, l'une étant représentée par le transcrit b, l'autre par les transcrits a₁ et a₂. Le cerveau est le seul tissu qui exprime les trois types de transcrit et il semble que le transcrit b soit majoritaire. Les données structurales du gène que nous avons pu recueillir, et notamment la distance séparant les exons E0 et E1, suggèrent très fortement que la transcription du gène *bST6Gal II* est sous la dépendance de 2 promoteurs distincts P_A et P_B (Figure 53 ; Figure 59A). Afin de donner

plus de poids à cette hypothèse, nous avons analysé *in silico* la séquence génomique située en amont de l'exon E0 et celle de l'intron I0 dans le but d'y détecter d'éventuels sites de liaison pour des facteurs de transcription. Ce travail a été réalisé à l'aide des logiciels *ModelInspector* et *MatInspector* de Genomatix et notre analyse met en évidence la présence des deux régions promotrices. Le promoteur P_A est situé juste en amont de l'exon E0 et sa taille est estimée à 601 paires de bases. Il contient deux sites de fixation pour le facteur SP1, un site pour AP1 et un pour NF1 (Figure 60). La séquence du promoteur P_B s'étend quant à elle sur environ 1129 paires de bases dans une zone située 200 bases en amont de E1. Cette région promotrice renferme sur le brin sens du chromosome BTA 11 un site de liaison pour le facteur SP1F, deux sites de fixation pour SMAD et un pour CREB. Notons enfin que cette région promotrice P_B est conservée dans le locus humain et qu'elle est retrouvée dans quasiment tous les locus orthologues.

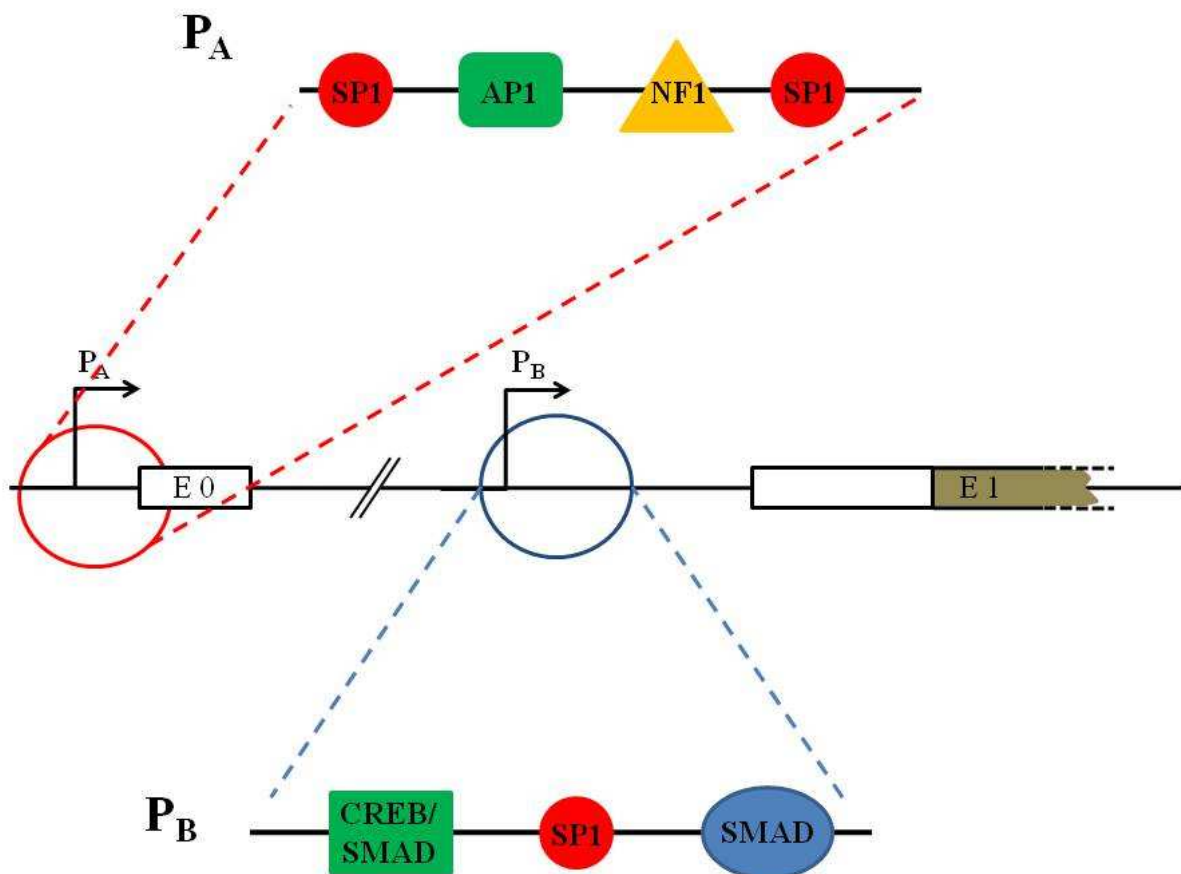


Figure 60 : Représentation schématique des 2 régions promotrices de *bST6Gal II*. En haut est représenté un agrandissement de la région promotrice P_A avec les sites de liaison potentiels de facteurs de transcription localisés sur le brin + du chromosome. En bas, la représentation de la région promotrice P_B sur laquelle sont indiqués les sites potentiels de fixation de facteurs de transcription sur le brin +. Le promoteur P_A a une taille de 601 paires de bases alors que P_B mesure 1126 paires de bases.

1.4. Analyse de la spécificité de substrat de formes recombinantes de bST6Gal II

Après avoir déterminé de manière fine la structure génique et le profil d'expression tissulaire de *bST6Gal II*, nous avons voulu préciser certaines des propriétés enzymatiques de la sialyltransférase qu'il code et plus particulièrement les spécificités de substrat accepteur. Notre stratégie a consisté à produire bST6Gal II sous la forme d'une protéine recombinante dans un système d'expression hétérologue eucaryote, en l'occurrence les cellules de mammifères COS-1. Plusieurs raisons nous ont amené au choix de ces cellules. En premier lieu, ces cellules ont un temps de génération assez court et les protocoles relatifs à leur transfection sont parfaitement maîtrisés et mis en œuvre depuis de très nombreuses années au laboratoire. De plus, les cellules COS-1 produisent l'antigène T qui est nécessaire pour la production transitoire des protéines recombinantes. L'argument majeur pour l'utilisation de ces cellules dans le cadre de cette étude vient du fait qu'elles ne possèdent aucun des gènes codant pour les β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase, ce qui nous évite de ce fait toute erreur d'interprétation de nos résultats pouvant être liée à la présence de protéines endogènes.

Par ailleurs, nous avons choisi de produire deux formes de ST6Gal II. La première de ces formes correspond à l'enzyme sous sa forme native, à savoir une protéine transmembranaire de type II, la seconde à l'enzyme tronquée des 40 premiers acides aminés N-terminaux. Produire cette forme tronquée de l'enzyme a pour but de faciliter l'étude des propriétés enzymatiques. En effet, ces acides aminés N-terminaux correspondent aux parties cytosolique, membranaire et à une portion de la région tige de la sialyltransférase. La délétion de ces différentes parties rend donc la protéine soluble et nous permet de la faire sécréter dans le milieu de culture. Ce milieu pourra alors directement servir de source enzymatique pour les tests d'activité. Que ce soit pour l'une ou l'autre des deux formes, le travail a commencé par l'amplification des ADNc qui les code en prenant comme matériel biologique de départ des ADNc aux ARNm de cerveau bovin. Ces ADNc ont ensuite été respectivement insérés soit dans le vecteur pFlag-CMV-2 pour l'ADNc codant la forme entière, soit dans le vecteur pFlag-CMV-1 pour celui qui permet la production de l'enzyme tronquée et soluble. A la différence du pFlag CMV-2, le vecteur CMV-1 contient une séquence codant un peptide de sécrétion. Après sélection des clones positifs pour chacune des constructions, et surtout après avoir vérifié l'exactitude des différentes séquences, nous avons effectué la

transfection transitoire des cellules COS-1 avec l'un ou l'autre des vecteurs recombinants. Nous avons également réalisé une transfection avec un vecteur vide, cette population de cellules étant notre témoin. Après 48h de transfection, les milieux de culture conditionnés et les cellules transfectées ont été récupérés et utilisés pour des tests d'activités.

L'activité sialyltransférasique de bST6Gal II a été testée sur 3 arylglycosides différents, Type I-octyl (Gal β 1,3GlcNAc-octyl), Type II-octyl (Gal β 1,4GlcNAc-octyl), LacdiNAc-octyl (GalNAc β 1,4GlcNAc-octyl) et sur une glycoprotéine qui présente des structures glycaniques de type Gal β 1,4GlcNAc, « l'Asialo- α 1-Acidglycoprotein ». Nous avons également utilisé comme substrat cette même protéine sous sa forme sialylée, « α 1-Acidglycoprotein », qui a la particularité de ne porter que des chaînes glycaniques de type NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc.

Il est important de noter que ces enzymes sont capables de transférer de l'acide sialique sur des structures oligosaccharidiques, que celles-ci soient sous forme libre ou liées à des protéines (Tableau VII). D'autre part, nous avons pu mettre en évidence que les formes membranaires et solubles présentent des profils de spécificité de transfert de l'acide sialique similaires, ceci nous laissant penser que la région tige de l'enzyme n'a pas d'incidence directe sur le mécanisme catalytique. En ce qui concerne la spécificité d'accepteur, la première chose que nous remarquons est le fait que ces deux enzymes bovines ne peuvent ni l'une ni l'autre transférer d'acide sialique sur des structures oligosaccharidiques de type I (Tableau VII). A l'inverse, nos données expérimentales montrent que chacune des protéines recombinantes a la capacité de sialyler les oligosaccharides de type II Gal β 1,4GlcNAc et que ST6Gal II a une nette préférence pour ce substrat lorsque celui-ci est sous forme d'un oligosaccharide libre. En effet, nous avons observé que le taux de transfert d'acide sialique sur les glycoprotéines est 2,9 fois inférieur pour la forme membranaire et 4 fois inférieur pour la forme soluble à celui observé sur les arylglycosides (Tableau VII).

De plus, il semble que les deux enzymes soient incapables de sialyler le motif Sialyl- α 2,6-lactosamine comme nous l'indique l'absence de transfert sur « l' α 1-Acid glycoprotein » (Tableau VII) et donc que cette enzyme n'a pas d'activité α 2,3-sialyltransférasique. Enfin, notre travail met clairement en évidence que le substrat accepteur préférentiel des ST6Gal II que nous avons produites sous formes recombinantes est le motif LacdiNAc (GalNAc β 1,4GlcNAc). Il s'avère en effet que l'activité de transfert de l'acide sialique sur cette structure est 4,2 fois

supérieure à celle observée sur un oligosaccharide de type Gal β 1,4GlcNAc pour la forme membranaire et 5,3 fois pour la forme soluble (Tableau VII).

Tableau VII: Activité relative des formes membranaires et solubles de ST6Gal II bovines recombinantes. Les arylglycosides ont été utilisés à une concentration finale de 1 mM et les glycoprotéines à la concentration de 2 mg/ml. Le taux d'incorporation d'acide sialique sur l'arylglycoside Gal β 1,4GlcNAc-R a servi de référence pour calculer le pourcentage d'incorporation d'acide sialique sur les autres substrats accepteurs.

Substrats accepteurs	bST6Gal II (% relatif d'activité)	
	<u>Forme membranaire</u>	<u>Forme soluble</u>
<i>Galβ1-4GlcNAc-octyl</i>	100 (0.85) ^a	100 (0.94) ^a
<i>Galβ1-3GlcNAc-octyl</i>	0	0
<i>GalNAcβ1-4GlcNAc-octyl</i>	312	346
<i>Asialo-α1-acid-glycoprotein</i>	34	25
<i>α1-acid-glycoprotein</i>	0	0

^a les activités sont de 0,85 pmol.h⁻¹ pour la forme membranaire et de 0,94 pour la forme soluble de ST6Gal II. ces activités ont été normalisées à 100%

Enfin, nous avons comparé les valeurs de Km des deux enzymes recombinantes bovines pour la N-acétyllactosamine et pour le LacdiNAc et les valeurs obtenues pour l'une et l'autre des formes peuvent être considérées comme identiques (Tableau VIII). De plus, ces résultats confortent le fait que ST6Gal II a une meilleure affinité pour le LacdiNAc que pour le LacNAc, le Km de l'enzyme pour ce dernier étant deux fois supérieur à celui observé pour le LacdiNAc (Tableau VIII).

Tableau VIII : Km des formes recombinantes bovines de ST6Gal II pour le LacNAc et le LacdiNAc.

Substrats accepteurs	Km (mM)	
	<u>Forme membranaire</u>	<u>Forme soluble</u>
<i>Galβ1-4GlcNAc-octyl</i>	2.12	2.04
<i>GalNAcβ1-4GlcNAc-octyl</i>	1.09	0.97

1.5. Effets des interleukines IL-1, IL-6 et TNF α sur l'expression des gènes *bST6Gal I* et *bST6Gal II* dans les cellules bovines de glande mammaire

Au cours de la réponse inflammatoire, le métabolisme cellulaire est profondément modifié. Outre la production de molécules pro-inflammatoires, la glycosylation des protéines cellulaires subit d'importants remaniements, dont l'essentiel des modifications a lieu au niveau des structures périphériques. Plusieurs études font état de profonds changements du profil de sialylation des glycoprotéines de la surface cellulaire en conditions inflammatoires, et, depuis maintenant quelques années, ST6Gal I est considérée comme une des protéines de la phase aigüe de l'inflammation (Jamieson *et al.*, 1993).

Lors d'une des pathologies les plus fréquentes chez le ruminant laitier, la mammite, il y a production de certaines cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α . Or, il a été montré que l'expression du gène *mST6Gal I*, dans un foie soumis à un stress inflammatoire, était fortement stimulée par l'IL-6 (Dalziel *et al.*, 1999). Nous nous sommes donc intéressés aux variations d'expression des deux gènes codant les β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases dans des cellules épithéliales de glande mammaire bovine au cours de la réponse inflammatoire. Pour répondre à cette question, nous avons essayé de créer plusieurs modèles *in vitro* mimant certaines des conditions physiologiques retrouvées au cours de la phase aigüe de l'inflammation. Ces modèles ont été réalisés à partir de cultures primaires de cellules épithéliales de glande mammaire à confluence (Figure 61), ces dernières étant maintenues en culture en présence de cytokines pro-inflammatoires sur une durée maximale de 48 heures. L'induction de la réponse inflammatoire par le LPS a été exclue du fait de l'absence de récepteur toll à la surface cellulaire. De façon intéressante, aucune différence phénotypique n'a été observée entre les cellules quiescentes et les cellules en phase inflammatoire (Figure 61).

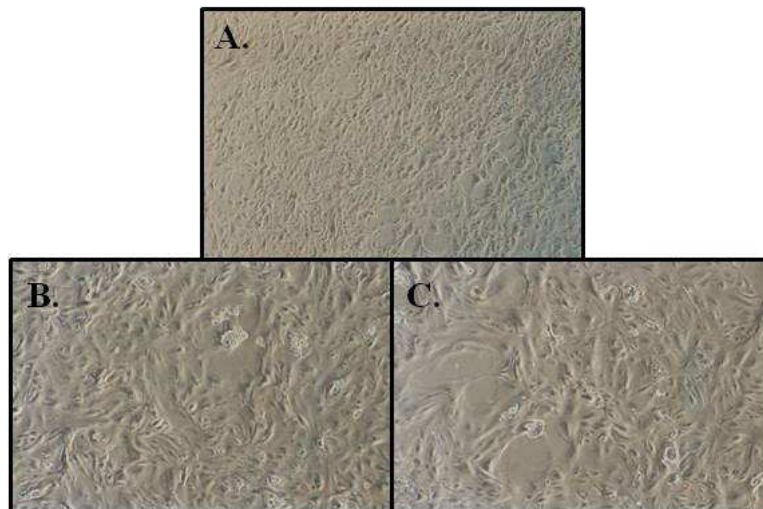


Figure 61 : Cellules épithéliales de glande mammaire bovine en culture primaire. Les cellules à confluence (A) sont traitées (B) ou non (C) par des cytokines pro-inflammatoires qui sont directement introduites dans le milieu de culture à une concentration finale de 15 ng/ml. Après la période d'incubation, les cellules sont récupérées et utilisées pour des analyses transcriptionnelles ou protéiques.

1.5.1. Au niveau transcriptionnel

Les cellules ont été traitées séparément soit avec de l'IL-1, soit par l'IL-6 ou le TNF α . Nous avons réalisé une cinétique d'incubation qui s'est étalée sur 5 temps différents : 6, 12, 18, 24 et 48 heures. A chacun de ces temps, nous avons déterminé par RT-PCR quantitative les variations des niveaux d'expression relatifs des gènes *ST6Gal I* et *II* entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées. Ces rapports d'expression ont été calculés par la méthode du $\Delta/\Delta C^t$ en normalisant les résultats par rapport au gène codant la GAPDH. Les résultats présentés sont la compilation des données issues de deux cinétiques distinctes pour lesquelles chaque point a été mesuré trois fois. Nous avons considéré que les variations d'expression des gènes étaient significatives dès le moment où la surexpression du gène devenait au moins 2 fois supérieure et la sous expression au moins 0,5 fois inférieure au nombre de transcrits présents dans les cellules non stimulées.

1.5.1.1. Après stimulation des cellules avec de l'IL-1

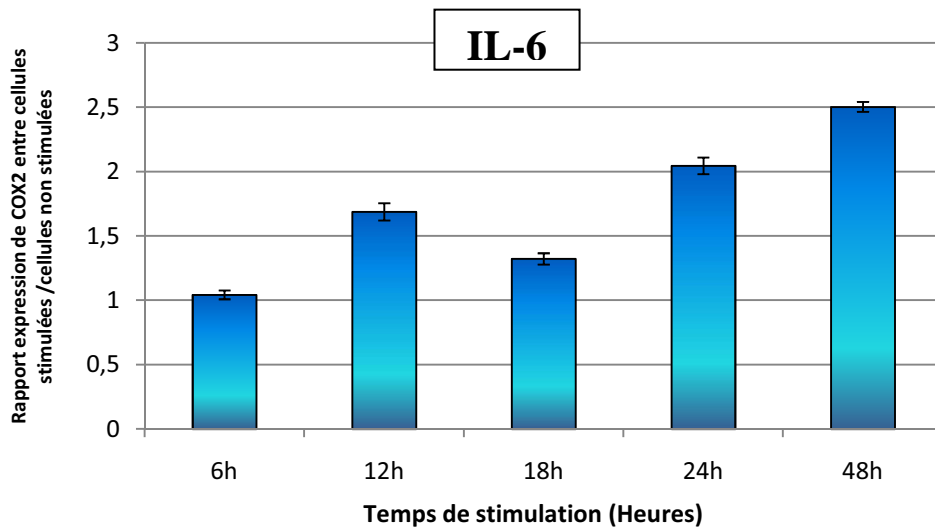
Pour chacun des traitements par une cytokine, nous avons d'abord vérifié qu'une réponse inflammatoire avait bien été induite sur les cellules. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression du gène *COX2* qui est surexprimé lors de la réponse inflammatoire, et qui est de ce fait considéré comme un bon marqueur de l'inflammation (Figure 62.2). Sur les cellules que nous avons traitées

avec l'IL-1, nos résultats indiquent qu'il y a une augmentation progressive de l'expression du gène *COX2* au cours du temps. Nous avons ainsi pu observer après 24 et 48h de stimulation que la quantité de transcrits étaient respectivement 3,4 et 4 fois supérieure à celle observée dans les cellules non stimulées (Figure 62.1 B). Bien que ces cellules aient parfaitement bien répondues au traitement par l'IL-1, nous n'avons pu constater aucune variation significative des niveaux d'expression des gènes *ST6Gal I* et *ST6Gal II*, les ratios d'expression entre cellules stimulées et non stimulées étant respectivement compris entre 1 et 1,21 et entre 0,88 et 1,12 (Figure 62.2.B), et donc considérés comme non significatifs.

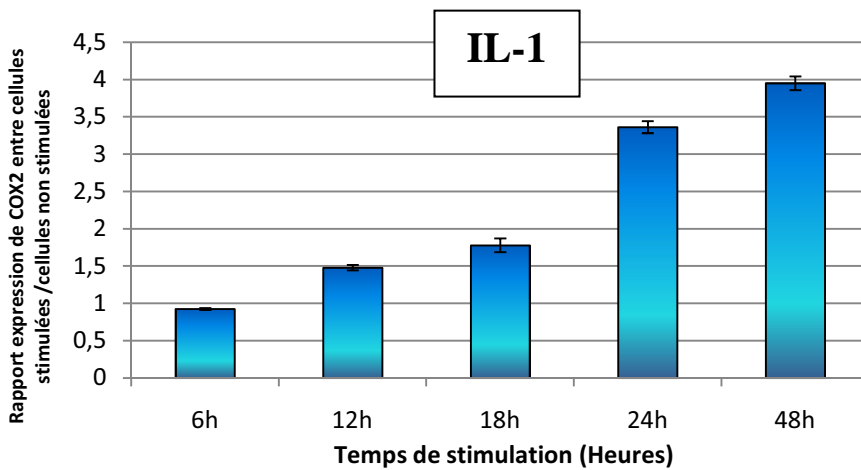
1.5.1.2. Après stimulation des cellules avec du TNF α

Dans le cas des cellules stimulées avec le TNF α , le constat est très similaire. A l'instar du traitement réalisé avec l'IL-1, les cellules réagissent très bien quand elles sont mises en contact avec un milieu de culture contenant du TNF α . En effet, nous observons bien une augmentation du taux de transcrit de *COX 2*, la réponse étant maximale après 24h d'incubation où le niveau d'expression de ce gène dans les cellules stimulées est 4,2 fois supérieur à celui des cellules non stimulées (Figure 62.1.C). Cependant, le taux de transcrits de *ST6Gal II* ne varie pas de manière significative sous l'influence du TNF α , les valeurs des ratios d'expression entre les deux populations de cellules oscillant entre 0,72 et 1,09 (Figure 62.2.C). Par ailleurs, nous remarquons que le niveau d'expression de *ST6Gal I* augmente sensiblement aux temps 6h et 18h de la cinétique, mais ces variations restent en dessous du seuil de significativité et sont difficilement interprétables voire artéfactuelles (Figure 62.2.C). En effet, étant donné que la réponse inflammatoire n'est pas encore induite au temps 6h, comme le révèle le niveau d'expression du gène *COX2*, le ratio de 1,69 ne semble guère être une donnée pertinente. L'augmentation apparente de 150% de la transcription de *ST6Gal I* après 18h de traitement ne nous semble pas non plus avoir un réel sens biologique. A ce moment de la cinétique, les cellules se trouvent en conditions inflammatoires, mais compte tenu du fait que la surexpression de *COX2* est plus importante aux temps 24h et 48h (ratios de 4,19 et 3,27, contre seulement 2,37 à 18h), nous aurions donc tendance à nous attendre à des niveaux d'expression de *ST6Gal I* croissants, ou tout du moins à des variations d'expression allant dans le même sens que celles que nous avons observées pour *COX2*. Or, à ces deux temps d'incubation, le nombre de transcrits *ST6Gal I* est équivalent entre cellules traitées et cellules non traitées (Figure 62.2.C). Ces données rendent très difficile l'interprétation quant à une réelle signification biologique.

A.



B.



C.

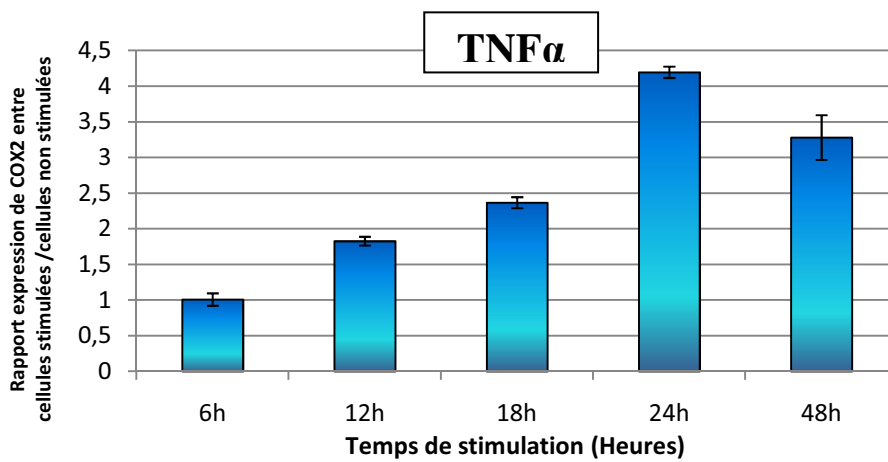
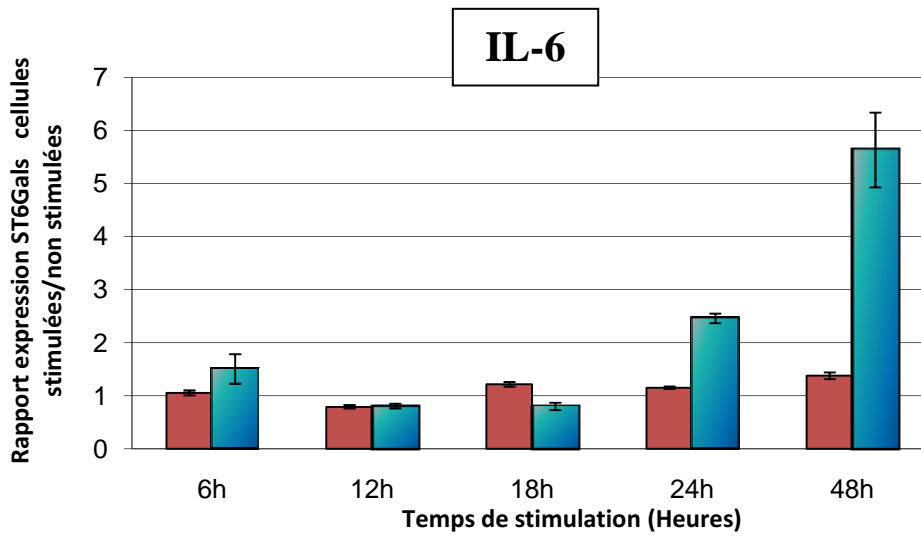
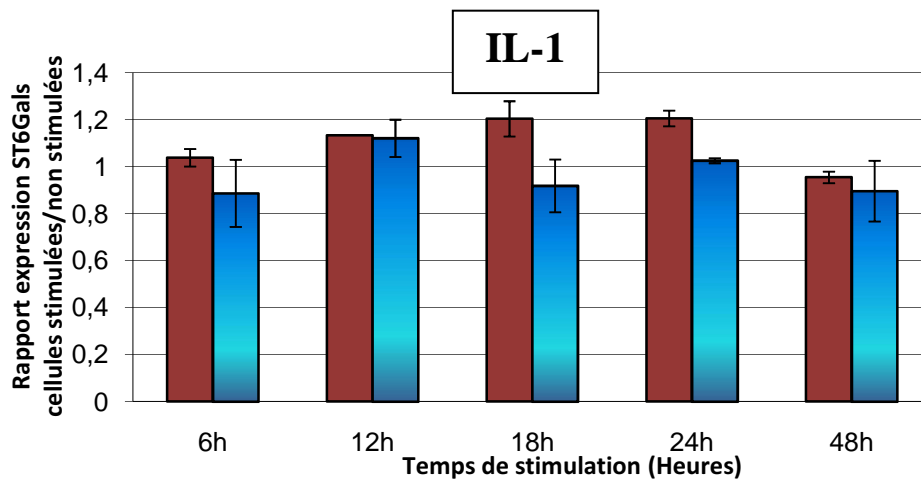


Figure 62.1

A.



B.



C.

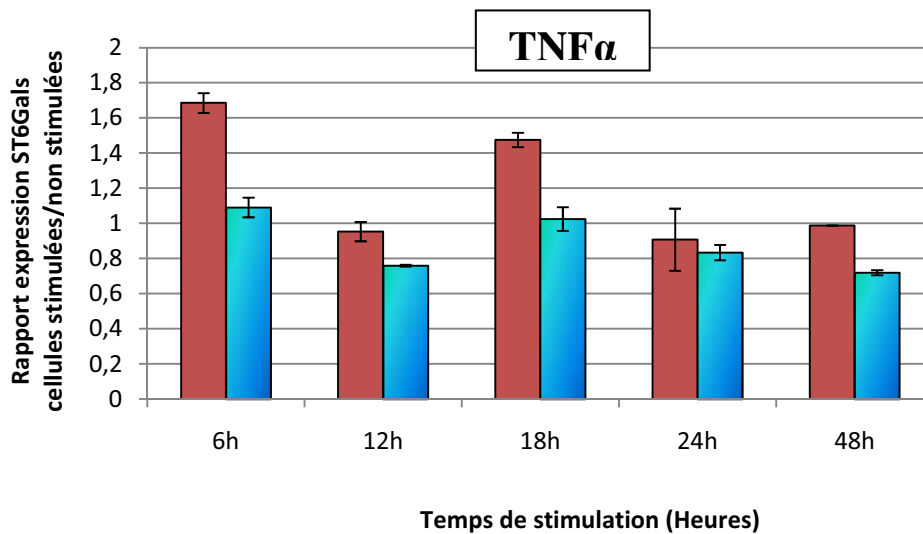


Figure 62.2

Figure 62 : Effet des traitements aux Interleukines 1 et 6 et au TNF α sur l'expression relative des gènes *ST6Gal I*, *ST6Gal II* et *COX2* dans des cellules épithéliales de glande mammaire bovine. Les cellules à confluence ont été stimulées par l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF α à une concentration finale de 10 ng.ml⁻¹ et ce pendant 6, 12, 18, 24 ou 48h. La variation de l'expression relative de ces gènes entre cellules stimulées et cellules non stimulées a été déterminée par RT-PCR quantitative et analysée par la méthode du $\Delta\Delta C^t$. La Figure 62.1 représente les rapports d'expression du gène *COX2* entre cellules stimulées et non stimulées par l'IL-6 (A), l'IL-1 (B) et le TNF α (C) au cours de la cinétique. Ce gène a été utilisé comme témoin de l'induction de la réponse inflammatoire. La figure 62.2 représente la comparaison des niveaux d'expression relatifs des gènes *ST6Gal I* et *II* après traitement à l'IL-6 (A), à l'IL-1 (B) et au TNF α (C). Pour chacun de ces graphiques, les histogrammes rouges correspondent à *ST6Gal I* et les histogrammes bleus à *ST6Gal II*. Que ce soit pour les Figures 62.1 ou 62.2, les résultats ont tous été normalisés par rapport au niveau d'expression relatif du gène de la GAPDH.

1.5.1.3. Après stimulation des cellules avec de l'IL-6

Alors que ni l'IL-1 ni le TNF α sont capables d'induire une augmentation significative de la transcription de l'un ou l'autre des deux gènes de β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases, l'IL-6 stimule au contraire la transcription de *ST6Gal II*. En effet, nous avons pu observer tout au long de la cinétique une hausse progressive de la quantité des ARNm de *ST6Gal II* (Figure 62.2A), mettant ainsi en évidence l'existence d'un lien direct entre cette cytokine et le système de régulation du gène. Le ratio de 1,5 au point 6 heures s'explique de la même manière que le premier point de la cinétique lors de la stimulation avec le TNF α et nous le considérons comme un artefact. Les autres points de la cinétique sont en revanche beaucoup plus informatifs et suivent la tendance générale observée pour *COX2*. A 12 et 18 heures après le début du traitement, nous n'observons pas de réponse de *ST6Gal II* dans les cellules, le nombre de transcrits pouvant être considéré comme équivalent à celui des cellules non stimulées (Figure 62.2A). Par contre, à partir de 24 heures, *ST6Gal II* commencent à être surexprimé de façon plus importante et le ratio atteint alors une valeur 2,5 fois supérieure à celle détectée dans les cellules témoins (Figure 62.2A). Cette augmentation de la transcription de *ST6Gal II* coïncide avec l'induction de la réaction inflammatoire dans les cellules, le ratio d'expression de *COX2* dépassant le seuil de significativité à ce stade de la cinétique (Figure 62.1A). Le taux de transcription de *ST6Gal II* continue d'augmenter jusqu'à la fin de la stimulation et nous pouvons observer qu'après 48 heures d'incubation, les cellules traitées à l'IL-6 renferment une quantité de messagers 5,63 fois supérieure à celle des cellules non traitées (Figure 62.2A). Pour autant, l'IL-6 ne semble pas avoir le même effet sur la transcription de *ST6Gal I* dont le niveau d'expression ne varie pas avec ou sans traitement par la cytokine (Figure 62.2A).

Enfin, nous pouvons nous interroger sur l'intensité de l'induction de la réponse inflammatoire au regard des informations recueillies sur les niveaux d'expression de *COX2* (Figure 62.1.A). La surexpression de ce gène au cours de la cinétique de stimulation des cellules à l'IL-6 apparaît moins importante que celles que nous avons pu observées lors des traitements à l'IL-1 (Figure 62.1.B) et au TNF α (Figure 62.1.C). La réaction inflammatoire induite serait en fait identique aux 2 autres, ce qui s'explique par le fait que l'Interleukine-6 est un moins bon activateur de la transcription de *COX2* (Léger, communication personnelle).

1.5.1.4. Expression des *ST3Gals* des cellules traitées à l'IL-6

Après avoir constaté que *ST6Gal II* répondait à la stimulation par l'IL-6, nous avons voulu voir ce qu'il en était pour les niveaux d'expression de *ST3Gal III* et *IV* durant cette même cinétique. En effet, les sialyltransférases codées par ces gènes utilisent les mêmes substrats accepteurs que notre enzyme d'intérêt, à savoir les structures N-acétyllactosaminiques (Gal β 1,4GlcNAc) des glycoprotéines. Ces enzymes seraient donc susceptibles d'entrer en compétition avec *ST6Gal II*.

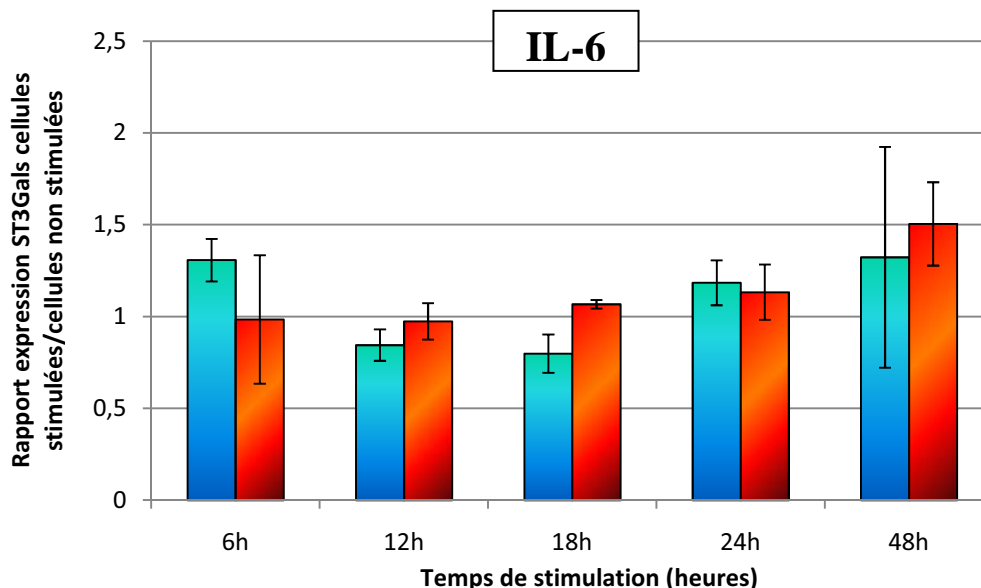


Figure 63 : Effet du traitement à l'Interleukine 6 sur le niveau d'expression relatif des gènes *ST3Gal III* et *ST3Gal IV* dans les cellules épithéliales de glande mammaire bovine. Ce graphique représente les ratios des quantités de transcrits pour chacun des gènes entre les cellules traitées avec l'IL-6 et les cellules non traitées, et ce tout au long de la cinétique. Les niveaux d'expression ont été déterminés par PCR quantitative et les données analysées par la méthode du $\Delta\Delta C^t$. Les barres bleues correspondent à *ST3Gal III* et les barres rouges à *ST3Gal IV*. Ces résultats ont été normalisés par rapport à la *GAPDH*.

Nous avons donc mesuré la quantité de transcrits pour ces 2 gènes dans les mêmes conditions que celles que nous avons utilisées précédemment. A première vue, que ce soit pour *ST3Gal III* ou *ST3Gal IV*, l'IL-6 n'a pas d'effet immédiat sur le taux de transcription des gènes dans ces cellules (Figure 63). Les variations sont en effet minimales, oscillant de 0,79 à 1,32 pour *ST3Gal III* et de 0,97 à 1,5 pour *ST3Gal IV*. Malgré le fait que ces données soient en dessous du seuil de significativité que nous nous sommes fixés, il est tout de même intéressant de noter l'allure générale de ces graphiques. En effet, ils nous montrent que le niveau d'expression de chaque gène a tendance à augmenter vers la fin de la cinétique, et il serait intéressant de voir comment ces gènes se comportent au-delà de 48 heures de traitement, et ce d'autant plus que les valeurs des écarts types obtenus à 48 heures sont assez importantes.

1.5.2. Au niveau protéique

L'observation de la modification de l'expression d'un gène dans certaines conditions physiologiques est une chose, mais il apparaît crucial de savoir si ces variations se traduisent par des changements à l'échelle protéique. Pour répondre à cette question, l'idéal serait d'effectuer une étude quantitative de *ST6Gal II* par des techniques immuno-cytochimiques, mais, malheureusement, nous ne disposons pas d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine. Ce problème est assez récurrent dans l'étude des glycosyltransférases mais peut être assez facilement contourné dans notre cas.

Nous avons pu montrer que, parmi les gènes des deux β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases et des deux β -Galactoside- α 2,3-sialyltransférases que nous avons sélectionnées, seul *ST6Gal II* voyait son taux de transcription être modulé au cours de la stimulation par l'IL-6. D'autre part, les sialyltransférases codées par ces gènes utilisent toutes le même type de substrat accepteur Gal β 1,4GlcNAc. Il apparaît alors qu'une analyse des structures glycaniques résultants de l'action de ces enzymes devrait nous permettre de répondre de manière indirecte à l'incidence de la surexpression du gène *ST6Gal II*. Toute modification évidente du profil de sialylation des glycoprotéines de surface pouvant en effet être attribuée à la présence accrue de la sialyltransférase *ST6Gal II* dans la cellule.

A partir d'un oligosaccharide de type II, il est possible de synthétiser des structures sialylées de type Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc si l'oligosaccharide est pris en charge par une *ST3Gal*, ou des structures

sialylées de type Sial α 2,6Gal β 1,4GlcNAc si il est utilisé par une ST6Gal. Chacune de ces structures est spécifiquement reconnue par une lectine, la MAA dans le cas de la Sialyl- α 2,3-lactosamine et la SNA pour la Sialyl- α 2,6-lactosamine. Nous avons effectué des Western blots sur 40 μ g d'extraits totaux des protéines de cellules épithéliales ayant été en contact ou non avec l'IL-6, le profil de sialylation de ces protéines étant alors révélé par l'addition de l'une ou l'autre des lectines (Figure 64).

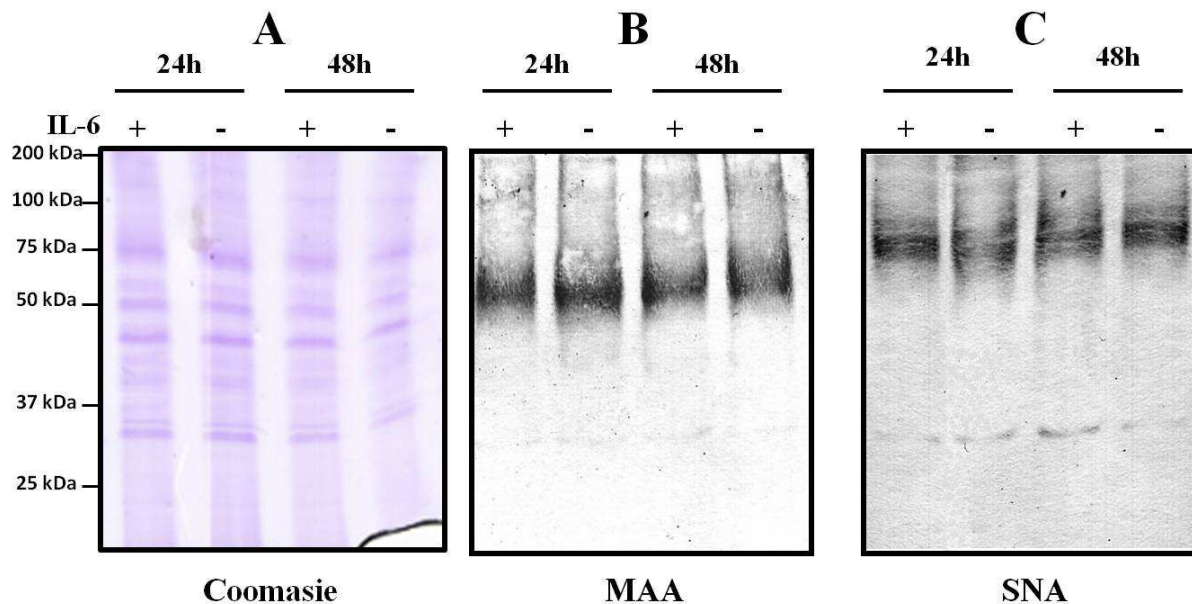


Figure 64 : Incidence du traitement à l'IL-6 sur le profil de sialylation des glycoprotéines des cellules épithéliales de glande mammaire. Pour les 3 gels, ont été déposés 40 μ g de protéines issues de cellules récupérées 24 ou 48 heures après le début de la cinétique et ayant été soumises (+) ou pas (-) au traitement à l'IL-6. En A le bleu de Coomassie des protéines, en B le western blot révélé à l'aide de la lectine MAA qui reconnaît le motif Sial α 2,3Gal et en C le western blot révélé par la lectine SNA reconnaissant le motif Sial α 2,6Gal.

Nos résultats montrent tout d'abord que les protéines arborant des motifs sialylés sont plutôt de taille assez conséquente, la quasi-totalité se situant dans l'intervalle 50-200 kDa. Nous remarquons également que le profil des protéines sialylées en α 2,3 présente quelques différences avec celui des protéines portant des motifs Sialyl- α 2,6-lactosaminiques (Figure 64). En effet, il semble que la plus forte concentration de protéines révélées par la MAA migrent aux alentours de 50-55 kDa (Figure 64B) alors que les protéines présentant une forte sialylation en α 2,6 ont une taille approximative de 75 kDa (Figure 64C). Nous pouvons aussi remarquer la présence d'une bande unique à 33 kDa qui est plus facilement observable lorsqu'elle est révélée par la SNA et ce d'autant plus après 48 H de stimulation avec l'IL-6 (Figure 64C).

Que les cellules aient été stimulées ou non à l'IL-6, le profil de sialylation des protéines en α 2,3 est identique entre les deux populations à 24 et 48h (Figure 64B), ce résultat allant dans le même sens

que nos observations sur les niveaux d'expression des gènes *ST3Gal III* et *IV* tout au long de la cinétique. En ce qui concerne les protéines sialylées en $\alpha 2,6$, il n'y a pas de différence clairement identifiable au niveau des protéines de haut poids moléculaire. Enfin, sur ce même panel, nous observons une très légère augmentation de l'intensité de la bande située à 33 kDa dans les cellules traitées 48 heures avec l'IL-6 (Figure 64C). Compte tenu de nos résultats d'analyse transcriptionnelle, cette variation pourrait être le fruit de l'augmentation du nombre de transcrits de *ST6Gal II* au temps 48h de la cinétique. Cette donnée est tout de même à considérer avec précaution et demande à être vérifiée par une analyse protéomique plus avancée.

1.6. Discussion

1.6.1. La famille des β -Galactoside- $\alpha 2,6$ -sialyltransférases

Les gènes de sialyltransférases et leurs produits sont impliqués dans un très grand nombre de processus physiologiques et pathologiques, l'importance de ces sialyltransférases étant confortée par le fait que ces enzymes sont retrouvées des arthropodes à l'homme en passant par les gnathostomes (Harduin-Lepers *et al.*, 2005). Cette famille de glycosyltransférases a particulièrement été bien décrite chez l'homme et la souris et se compose de vingt membres répartis en 4 sous-familles, là où, à l'heure actuelle, seule une quinzaine de gènes ont été identifiés chez le bovin. Parmi ces 4 sous-familles, il y a celle des β -Galactoside- $\alpha 2,6$ -sialyltransférases dont l'implication dans des processus tels que le développement tumoral (Lo *et al.*, 1999 ; Dall'Olio *et al.*, 2000 ; Hedlung *et al.*, 2008), la différenciation cellulaire (Taniguchi *et al.*, 2000a) ou encore la réponse inflammatoire (Kaplan *et al.*, 1983 ; Yasukawa *et al.*, 2005) a été mise en évidence.

Durant de très nombreuses années, cette famille ne se composait que d'un seul et unique membre, *ST6Gal I*, qui fut d'ailleurs la première sialyltransférase à être purifiée, et ce à partir du colostrum bovin (Paulson *et al.*, 1977). Le gène codant cette protéine bovine n'a été caractérisé que beaucoup plus tard par Mercier *et al.* en 1999. Ce gène a été trouvé exprimé de façon ubiquitaire tout comme ses homologues murin et humain (Kitagawa et Paulson, 1994). Dans ces trois espèces, le produit du gène est le principal acteur de la sialylation en $\alpha 2,6$ des chaînes glycaniques des glycoprotéines

présentant un résidu de galactose en position terminale. Cependant, Martin et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence en 2002 la persistance de structures oligosaccharidiques de type Sialyl- α 2,6-lactosamine chez des souris KO pour le gène *ST6Gal I*.

Ce résultat a fortement suggéré l'existence d'une seconde β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférase qui fut identifiée quelques temps plus tard chez l'homme (Takashima *et al.*, 2002; Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003) et chez la souris (Takashima *et al.*, 2003). Ces gènes humains et murins se sont révélés coder une enzyme dont la principale activité semble être liée à la sialylation en α 2,6 des oligosaccharides libres.

1.6.2. Analyse du gène *ST6Gal II* bovin et de son produit

Durant cette étude, nous avons cloné un ADNc qui code pour l'homologue bovin des enzymes *ST6Gal II* humaine et murine. Le gène, dénommé *bST6Gal II*, a pu être localisé sur le chromosome BTA 11 sur lequel il s'étend sur plus de 50 kpb. D'après nos observations, sa structure est très proche de celles qui ont été précédemment décrites dans d'autres espèces, démontrant ainsi le fait que *ST6Gal II* est un gène qui a particulièrement bien été conservé au cours de l'évolution. A l'instar de ses homologues humain et murin, le cadre ouvert de lecture du gène bovin est constitué de 5 exons (E1 à E5) et la comparaison ne s'arrête pas là. En effet, au-delà de leur nombre, les tailles des différents exons sont quasiment identiques et leurs séquences présentent des pourcentages d'identité inter-espèces élevés. Enfin, bien que les tailles des introns soient assez différentes d'une espèce à l'autre, il est tout de même possible de remarquer certaines similitudes dont notamment le classement des introns en fonction de leur taille, avec dans un ordre croissant I2, I3, I1 et I4.

La séquence protéique bovine montre que *bST6Gal II* partage les mêmes propriétés structurales que *hST6Gal II* et *mST6Gal II*. Cette enzyme a une topographie de glycoprotéine transmembranaire de type II et renferme dans la séquence de son domaine C-terminal catalytique les 4 motifs signatures hautement conservés des sialyltransférases, les sialylmotifs I (Large), II (Small), III et IV (VS), mais aussi et surtout les séquences des 3 motifs spécifiques des *ST6Gal* (Figure 56). Par ailleurs, la comparaison des séquences bovine, murine et humaine montrent un pourcentage d'identité compris

entre 66 et 68%, les plus grandes divergences se retrouvant au niveau des séquences des régions tige des enzymes. Un autre élément qui tend à montrer l'importance de la conservation inter-espèce de cette enzyme est la présence de sites de *N*-glycosylation. Il existe deux sites potentiels de *N*-glycosylation bornant le sialylmotif I (L), ces derniers étant strictement conservés dans les trois espèces. En plus de ces deux sites, la protéine humaine en contient un supplémentaire qui se situe dans la région tige, cette même région qui possède 35 acides aminés de plus que celle de l'enzyme bovine. L'importance et l'occupation de ces sites restent à démontrer pour notre enzyme mais il a déjà été mis en évidence que ces sites de *N*-glycosylation jouent un rôle très important dans le trafic intra-cellulaire et l'activité de hST6Gal I (Ma et Colley, 1996). Ces sites n'étant pas localisés dans les mêmes régions que ST6Gal I, il est donc difficile de prédire les rôles que pourraient avoir les éventuels glycannes de ST6Gal II. Il semble cependant que ces sites soient occupés comme le suggère Krzewinski-Recchi *et al.* (2003).

1.6.3. Activité enzymatique de l'enzyme bST6Gal II

A partir des données issues de nos tests d'activité, nous avons pu remarquer que l'une et l'autre des enzymes recombinantes que nous avons produites sont capables de transférer un résidu d'acide sialique sur un résidu de galactose d'une chaîne de type II. Comme nous avons pu le constater, les propriétés catalytiques de l'enzyme ne semblent pas être altérées par l'absence d'une partie de la région tige. En effet, aucune différence significative des propriétés enzymatiques des protéines membranaires et solubles n'a pu être mise en évidence au cours de nos expérimentations (Tableau V).

Les deux protéines recombinantes catalysent le transfert d'un résidu d'acide sialique à partir d'un substrat donneur activé, le glycosyl-nucléotide CMP-Neu5Ac, mais l'efficacité de la réaction est accrue lorsque le substrat accepteur est un oligosaccharide libre et non un oligosaccharide porté par un *N*-glycane de glycoprotéine. Il apparaît d'ailleurs que l'efficacité de transfert de bST6Gal II de l'acide sialique sur les *N*-glycannes est inférieure à celle observée pour les enzymes murine et humaine. L'enzyme bovine a pour substrat préférentiel l'oligosaccharide LacdiNAc tout comme son homologue humain. Cette enzyme a donc toutes les caractéristiques structurales d'une β -

galactoside- α 2,6-sialyltransférase mais se comporte catalytiquement comme si elle appartenait à la famille des β -N-acétylgalactosamine- α 2,6-sialyltransférases (ST6GalNAc).

La comparaison des propriétés enzymatiques des deux β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases bovines, ST6Gal I et II, permet de se rendre compte qu'elles présentent des spécificités de substrat très différentes. Comme nous venons de le décrire, ST6Gal II a une préférence marquée pour les oligosaccharides libres et n'a qu'une faible activité de transfert sur les glycoprotéines. A l'inverse, ST6Gal I catalyse principalement la sialylation en α 2,6 des glycoprotéines et son activité sur des structures oligosaccharidiques libres est assez restreinte.

La biosynthèse chez le bovin du motif Sialyl- α 2,6-lactosamine serait donc assurée par deux enzymes distinctes présentant des spécificités de substrat différentes mais complémentaires. Cette conclusion nous laisse fortement penser que chacune des deux β -Galactoside- α 2,6-sialyltransférases assurerait une fonction physiologique spécifique et que la présence de deux gènes codant pour des enzymes ayant le même type d'activité catalytique ne serait pas une redondance au sein du génome bovin.

Par ailleurs, le fait que l'enzyme soit toujours active sous forme soluble est une propriété partagée par un grand nombre de sialyltransférases et ce contrairement à d'autres glycosyltransférases, dont les fucosyltransférases Fut4 et Fut9 bovines (Thèse Javaud, 2002), pour lesquelles la suppression de la région tige a pour conséquence la perte totale de l'activité catalytique. Ces formes tronquées et solubles, qui sont particulièrement pratiques dans le cadre de l'étude des propriétés enzymatiques des sialyltransférases, ne sont pas qu'une bizarrerie de laboratoire, et certaines enzymes dont ST6Gal I, ont pu être identifiées *in vivo* sous cette forme. *In vivo*, les formes tronquées résultent d'un clivage au niveau de la région tige par des protéases telles que les catépsines (Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 1999). La proportion en protéines solubles augmente assez fortement durant la réponse inflammatoire (Jamieson *et al.*, 1993) mais le rôle de ces sialyltransférases reste toujours inconnu.

ST6Gal I est largement sécrétée lors de la phase aigüe de l'inflammation et il a été montré qu'elle conservait son activité enzymatique. Cependant, quel rôle peut-elle jouer dans le milieu extracellulaire alors que celui-ci ne contient pas ou trop peu de son substrat donneur le CMP-NeuAc ? Parmi les fonctions attribuées aux structures sialylées, est retrouvé le rôle de récepteur/site

de fixation de certains pathogènes (Karlsson *et al.*, 1995). Ainsi, il est envisageable que les sialyltransférases solubles assurent un rôle de lectine, qui, en se fixant sur les acides sialiques présents à la surface cellulaire, masquent des sites potentiels de fixation de pathogènes. Cette hypothèse, très attrayante, ne semble pas être applicable pour le moment dans le cas de ST6Gal II pour laquelle la présence de formes solubles de l'enzyme dans les fluides biologiques n'a pas encore pu être détectée. Cependant, une analyse de la séquence primaire de ST6Gal II révèle l'existence d'un site potentiel de clivage au niveau d'une région voisine de celle décrite pour ST6Gal I (Ma *et al.*, 1997).

1.6.4. Expression tissulaire de *bST6Gal II*

Les deux gènes de β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases connues jusqu'à aujourd'hui, *ST6Gal I* et *II*, présentent des profils d'expression tissulaire très différents. Alors que le gène *ST6Gal I* est exprimé de manière ubiquiste chez l'homme (Kitagawa et Paulson, 1994), la souris (Hamamoto *et al.*, 1993) et le bovin (Mercier *et al.*, 1999), le profil d'expression tissulaire de *ST6Gal II* est beaucoup plus restreint. Chez l'homme, le gène est principalement exprimé dans le cerveau (rare tissu dans lequel *ST6Gal I* est faiblement exprimé (Kitagawa et Paulson, 1994)), les ganglions lymphatiques, les testicules et la glande thyroïde (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003), la souris présentant des niveaux d'expression plus importants dans le cerveau et chez l'embryon (Takashima *et al.*, 2003). Nous avons pour notre part montré que le gène bovin est principalement transcrit dans les poumons, le cerveau, le colon et le foie. Cependant, l'expression tissulaire de *ST6Gal II* bovin n'apparaît pas aussi restrictive que chez l'homme ou la souris puisqu'il est également exprimé dans les glandes mammaires et salivaires, et plus faiblement au niveau du muscle squelettique. Ces différentes observations nous amènent à penser que l'expression du gène *ST6Gal II* est de manière générale plus restreinte que celle de *ST6Gal I*, mais également qu'il présente un profil d'expression tissulaire espèce spécifique.

Au cours de notre étude, nous avons pu observer que ce gène *ST6Gal II* pouvait être exprimé sous la forme de trois transcrits qui ne diffèrent que par leur région 5' non traduite. Le premier de ces transcrits (transcrit b) n'est retrouvé qu'au niveau du cerveau et sa structure est assez simple. En effet, sa région 5' non traduite se constitue de la totalité de la séquence non traduite de l'exon E1.

Les deux autres transcrits que nous avons pu isoler ont des structures très proches et proviennent d'un phénomène d'épissage alternatif. Ils sont composés des 46 premières bases situées en amont du point d'initiation de la traduction de l'exon E1 auxquelles il faut ajouter soit la totalité de la séquence de l'exon E0 pour obtenir le transcrit a_1 soit les 25 dernières bases de ce même exon dans le cas du dernier transcrit (transcrit a_2). Tout comme pour le transcrit b, le transcrit a_1 n'a été retrouvé qu'au niveau du cerveau alors que le transcrit a_2 est présent dans tous les tissus où s'exprime le gène.

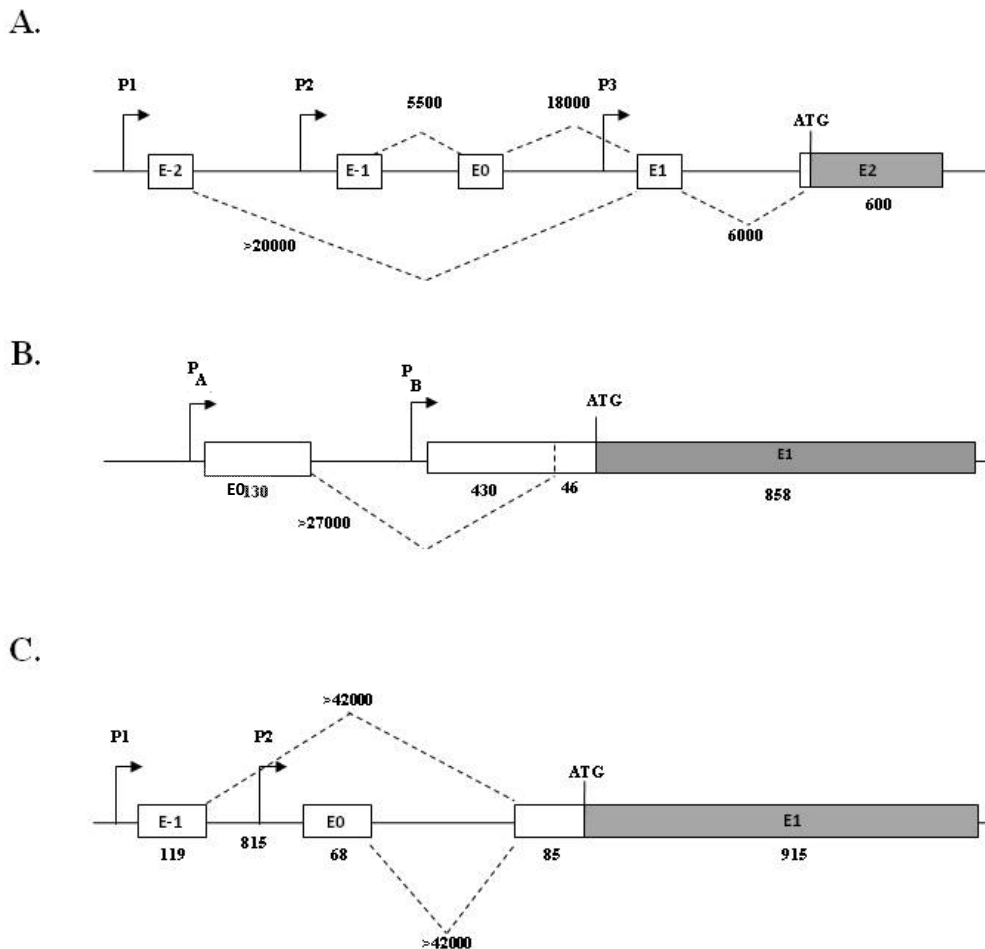


Figure 65 : Organisation génique des parties 5' non codantes de *bST6Gal I* (A) et de *bST6Gal II* (B) et de *hST6Gal II* (C). Les exons non codants sont représentés par les rectangles blancs, les exons codants par des rectangles gris, les introns par des traits pleins. Les tailles des introns et des exons sont indiquées en paires de bases (pb). Les régions promotrices sont représentées par des flèches noires. Les traits en pointillés représentent les évènements d'épissage alternatif pouvant avoir lieu au cours de la maturation des ARNm.

Les transcrits du gène bovin *ST6Gal I* présente également une grande diversité de leurs régions 5' non traduites, une diversité due à de phénomènes d'épissage alternatif des 4 exons non traduits (Mercier *et al.*, 1999). Les auteurs décrivent également l'existence de 3 promoteurs qui sont utilisés de manière tissu spécifique (Figure 65A). Concernant *ST6Gal II*, les exons E0 et E1, impliqués dans la formation par épissage alternatif des transcrits matures, sont séparés par plus de 27 kpb. Cette

distance entre ces deux exons suggère l'existence et l'utilisation de deux promoteurs différents (Figure 65B). Cette hypothèse semble d'ailleurs se confirmer par l'identification de sites potentiels de fixation de facteurs de transcription tels que CREB, SMAD, AP1, SP1 et NF1 en amont des exons E0 et E1 (Figure 60). Dans l'état actuel des connaissances, la transcription du gène orthologue humain à *bST6Gal II* serait lui aussi sous la dépendance de 2 promoteurs distincts (Figure 65C). Les deux régions promotrices de *hST6Gal II* sont proches l'une de l'autre, séparées par une séquence d'environ 1 kpb (Takashima *et al.*, 2002), alors que celles de *bST6Gal II* sont distantes de plus de 27 kpb. Enfin, il est très intéressant de noter que les régions promotrices P1 et P_B des formes humaines et bovines sont considérées comme orthologues, et, au-delà de ça, une analyse globale des banques de données d'ADN génomique prédit que cette région promotrice est conservée chez quasiment tous les mammifères. D'après nos résultats et les données que nous avons pu recueillir sur ce gène dans d'autres espèces, *ST6Gal II* serait donc un gène soumis à une régulation transcriptionnelle assez fine. De plus, l'utilisation alternative de l'un ou l'autre des promoteurs associée à un profil d'expression tissulaire assez restreint laisse penser que le produit de *ST6Gal II* aurait une fonction physiologique bien spécifique.

1.6.5. *bST6Gal II*, un gène impliqué dans la réponse inflammatoire

Alors que *ST6Gal I* a été décrite comme l'enzyme responsable de la sialylation en $\alpha 2,6$ des *N*-glycoprotéines (Weinstein *et al.*, 1987) et qu'elle est considérée comme l'une des protéines de la phase aigue de l'inflammation, aucune fonction n'a été clairement attribuée jusqu'à présent à *ST6Gal II*. Cependant, son profil d'expression tissulaire restreint, à la fois observé chez l'homme, la souris et le bovin, suggère qu'elle ait certaines contributions physiologiques particulières dont l'une d'entre elles pourrait être associée à l'inflammation. Lors de la réponse inflammatoire, il a été observé que la sialylation des glycoprotéines pouvait être modifiée par l'augmentation d'épitopes Sialyl- $\alpha 2,6$ -lactosamines aux dépens d'épitopes Sialyl- $\alpha 2,3$ -lactosamines (Gagneux and Varki, 1999 ; Yazukawa *et al.*, 2005). Cette augmentation du taux d' $\alpha 2,6$ -sialylation des antennes glycaniques des glycoconjugués de surface tend à inhiber l'attachement des pathogènes sur les cellules hôtes (Figure 66) et de ce fait contribue à limiter l'effet d'une seconde vague infectieuse potentielle (Gagneux et Varki, 1999, Gagneux *et al.*, 2003). Ce type de réponse a notamment pu

être observé au niveau de l'épithélium intestinal et au niveau hépatique mais n'a pas encore été décrit au niveau de la glande mammaire.

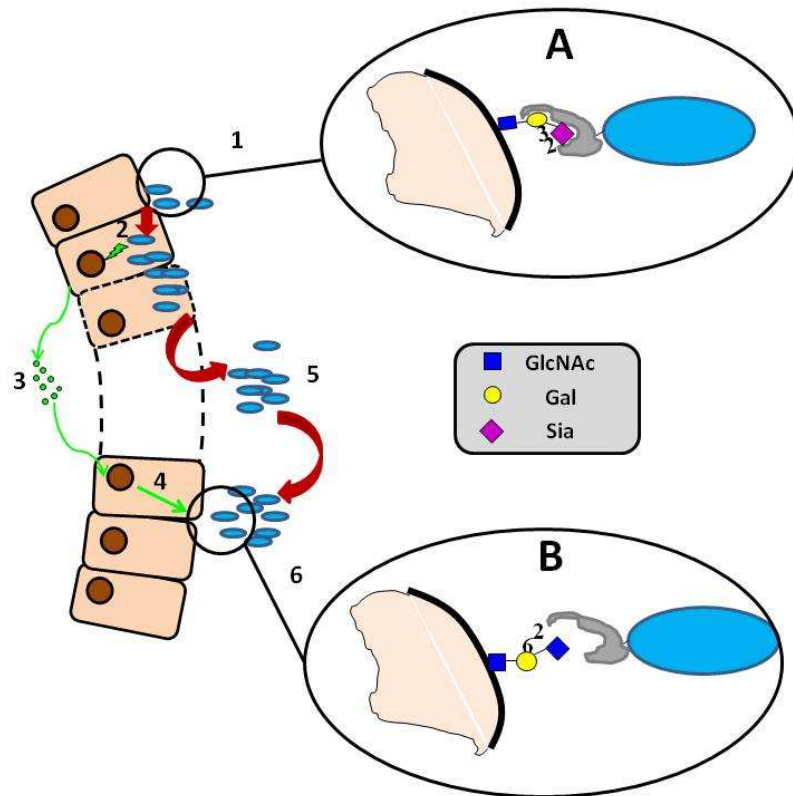


Figure 66 : Représentation schématique des interactions hôtes-pathogène et de la réponse cellulaire qui s'en suit. L'étape 1 représente l'interaction entre le pathogène (bleu) et la cellule hôte (rose). L'agrandissement A schématise la fixation du pathogène sur son récepteur, la Sialyl- α 2,3-lactosamine. Dans un deuxième temps (2), le pathogène internalisé se multiplie ce qui a comme conséquence d'induire la production de molécules pro-inflammatoires (flèche verte). Les cytokines produites sont alors sécrétées (3) dans le milieu extracellulaire et vont aller stimuler les cellules avoisinantes. La transcription de gènes comme *ST6Gal I* augmente alors dans les cellules stimulées (4), ce qui a pour effet de modifier la sialylation de leurs glycoprotéines de surface. Après s'être multipliés et avoir tué la cellule hôte (cellule en pointillés), les pathogènes cherchent un nouvel hôte (5). L'apparition de la Sialyl- α 2,6-lactosamine à la surface cellulaire rend l'interaction entre le pathogène et la cellule beaucoup plus compliquée (6, agrandissement B) ce qui limite la propagation de l'infection.

En effet, dans un grand nombre de tissus, les *N*-glycannes sialylés des glycoprotéines de la surface cellulaire se composent majoritairement de l'épitope Sialyl- α 2,3-lactosamine, structure utilisée comme point d'attachement par certains pathogènes. En réponse à l'interaction hôte-pathogène, la cellule va réagir par la production de molécules pro-inflammatoires que sont les cytokines. Ces molécules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et agissent de façon paracrine sur les cellules environnantes. Cette stimulation induit la transcription de nouveaux gènes ou la surexpression d'autres déjà présents. Le gène *ST6Gal I* a été montré comme un de ces gènes surexprimés

(Jamieson *et al.*, 1993). La sialyltransférase qu'il code, ST6Gal I, utilisant le même substrat donneur et le même type de substrat accepteur que certaines enzymes de la famille des ST3Gal, agit donc comme compétiteur de ces ST3Gal. De ce fait il y a une augmentation de la quantité d'épitopes Sialyl- α 2,6-lactosamines à la surface cellulaire ce qui limite les possibilités d'interaction du pathogène avec la cellule et donc l'infection.

Ainsi, nous avons regardé si *ST6Gal II* réagissait à un stimulus inflammatoire. Nous avons choisi d'utiliser comme modèle d'étude des cellules épithéliales de glande mammaire, celles-ci se retrouvant directement au contact des pathogènes lors de l'infection la plus commune de ces ruminants, la mammite. Durant la phase aigüe de l'inflammation liée à cette pathologie, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont produites parmi lesquelles l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α . C'est ainsi que des cultures primaires de ces cellules ont été stimulées à l'aide de ces cytokines dans le but de reproduire les conditions inflammatoires d'une mammite *in vitro*. Toutes les cultures ont parfaitement bien réagi à la stimulation comme en témoigne l'augmentation du niveau d'expression du gène *COX2*, un excellent marqueur de l'inflammation.

Nous n'avons pas observé de variations des niveaux d'expression de *ST6Gal I* et *ST6Gal II* suite aux traitements avec l'IL-1 ou le TNF α . En revanche, nous avons mis en évidence une surexpression du nombre de transcrits de *ST6Gal II* d'approximativement 2,5 et 5,6 fois par rapport aux cellules non stimulées après respectivement 24h et 48h de traitement des cellules à l'IL-6. De façon surprenante dans ce travail, aucun changement du niveau de transcription de *ST6Gal I* n'a été observé durant la cinétique de stimulation. *bST6Gal II* répond de façon positive au stimulus inflammatoire induit par l'interleukine 6, cependant, cette augmentation ne se traduit pas de façon évidente au niveau des structures glycaniques portées par les protéines des cellules. En effet, autant pour l' α 2,3-sialylation que pour l' α 2,6-sialylation, les profils sont très similaires entre les 2 populations de cellules à la seule exception d'une bande de 33 kDa dont l' α 2,6-sialylation semble augmenter.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, nous avons vu précédemment que l'activité de ST6Gal II est très faible sur les antennes glycaniques des glycoprotéines, celle-ci ayant une préférence marquée pour les oligosaccharides libres. Les cellules épithéliales de glande mammaire sont des cellules sécrétrices des oligosaccharides du lait et nous pouvons donc imaginer que l'augmentation de l'expression de *ST6Gal II* va permettre la

modification de la composition des oligosaccharides du lait. Maintenant, en quoi la modification de la composition structurale des oligosaccharides ou une augmentation significative de la quantité d'oligosaccharides libres dans le lait peut-elle avoir une incidence sur la réponse inflammatoire ? Une des possibilités à envisager est le fait que ces oligosaccharides libres, produits en réponse à la première vague infectieuse, jouent le rôle de structures leurres. En effet, l'occupation des sites de liaisons à la cellule hôte du pathogène par ces oligosaccharides empêcherait l'interaction hôte-pathogène et donc limiterait la seconde vague infectieuse (Figure 67).

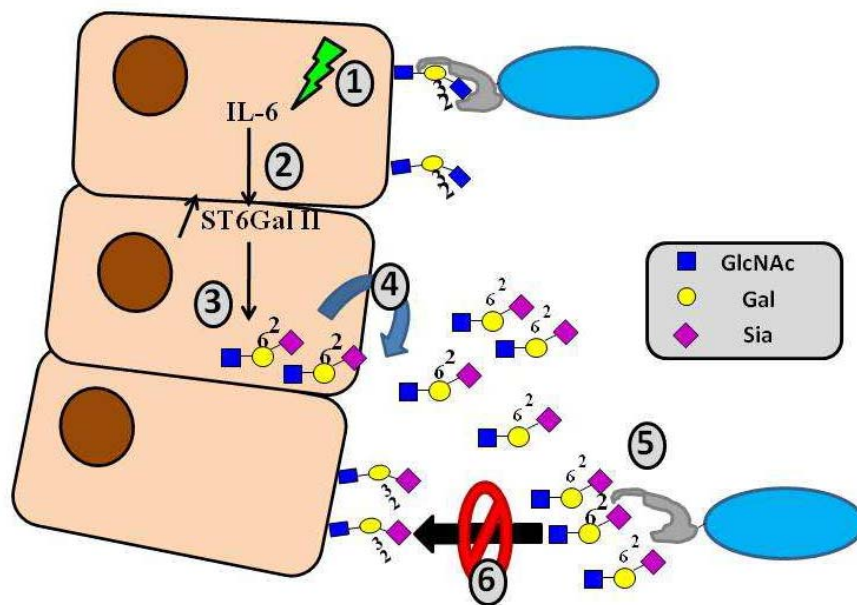


Figure 67 : Rôle potentiel de ST6Gal II dans la réponse inflammatoire. L'infection de la cellule hôte (rose) par le pathogène (bleu) induit la transcription et la production d'IL-6 (1), cette dernière stimule la transcription de ST6Gal II (2). ST6Gal II permet de synthétiser des oligosaccharides de type Sialyl- α 2,6-lactosamine (3) qui seront ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire (4). Ces oligosaccharides se fixent sur les récepteurs des pathogènes (5) qui ne peuvent plus interagir avec la cellule hôte (6).

Une autre hypothèse à prendre en considération pour expliquer le fait que nous n'ayons pas observé de modification du profil de sialylation cellulaire est le « turn over » des protéines. En effet, les variations du taux de transcription de *ST6Gal II* ne s'observent qu'après 24 et 48 heures de traitement des cellules. Etant donné que nous avons observé le niveau de sialylation des protéines à ces mêmes temps, il est fortement probable que les répercussions de la surexpression de *ST6Gal II* n'aient pas encore été répercutées au niveau des membranes cellulaires et qu'elles apparaissent après le dernier temps de notre cinétique.

Enfin, la dernière hypothèse que nous pouvons émettre vient de la comparaison des niveaux d'expression de *ST6Gal I* et *II* au cours de la cinétique qui met en évidence un gros déséquilibre (Figure 68), et ce tout autant dans les cellules témoins que dans les cellules stimulées par l'IL-6. En effet, cette analyse révèle que le nombre de transcrits de *ST6Gal I* est très supérieur à celui de *ST6Gal II*, *ST6Gal I* étant environ 20 fois plus exprimé que *ST6Gal II* dans les premiers temps de la cinétique dans les deux populations de cellules (Figure 68). Au bout de 24h de traitement, quand *ST6Gal II* commence à être surexprimé, le rapport entre la quantité de transcrit de ces deux gènes décroît et ne sera plus que de 4 lorsque la surexpression de *ST6Gal II* est maximale à 48h de traitement. Malgré la stimulation de la transcription de *ST6Gal II*, *ST6Gal I* reste majoritaire. Compte tenu des spécificités de substrats de l'une et de l'autre des enzymes et de leurs niveaux d'expression quasi identiques en fin de cinétique, il est tout à fait imaginable que l'effet de la surexpression *ST6Gal II* ne soit pas observable au niveau des glycoprotéines cellulaires en raison d'un court d'incubation en présence de l'IL-6 qui ne permet pas le renouvellement des structures de surface. Cependant, comme le substrat préférentiel de *ST6Gal II* est le motif LacdiNAc (GalNAc β 1,4GlcNAc), l'enzyme pourrait sialyler préférentiellement les glycoprotéines arborant ce type d'oligosaccharides, dont la bande observée à 33 kDa pourrait être un exemple.

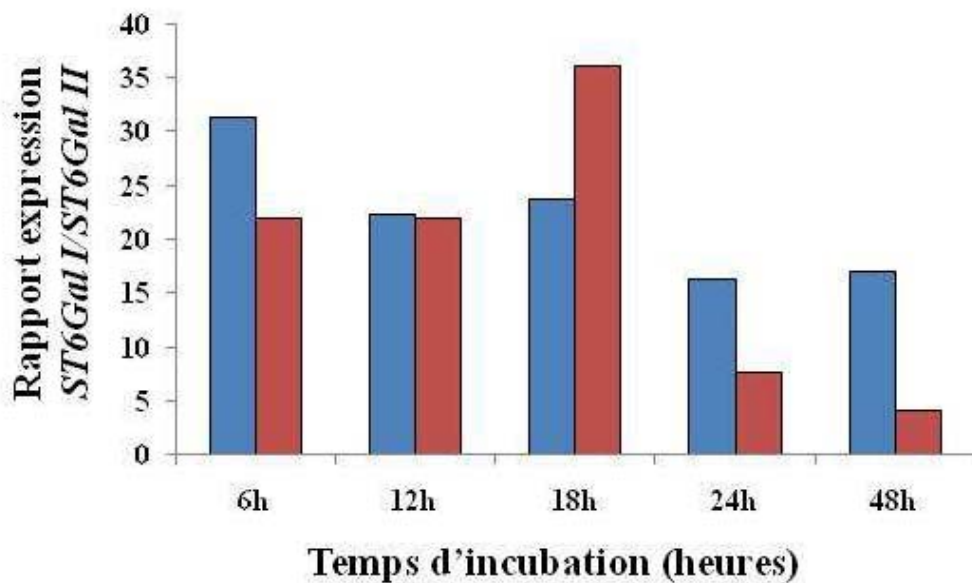


Figure 68 : Rapport de la quantité relative des transcrits de *bST6Gal I* par rapport à celle des transcrits de *ST6Gal II* dans les cellules épithéliales de glande mammaire bovine. En bleu, est représenté ce rapport dans les cellules non stimulées et en rouge tout au long de la stimulation par l'IL-6. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression de la *GAPDH*.

Sans avoir défini le mode d'action de *ST6Gal II* au cours de la réponse inflammatoire, il semble maintenant évident que ce gène a un rôle à jouer dans ce phénomène. En effet, le gène répond à

l'IL-6 par une surexpression des transcrits α_2 . Ce résultat est cohérent avec le fait que ce transcrit est sous la dépendance du promoteur P_A qui contient un site de fixation pour le facteur de transcription AP1 produit terminal de la voie de signalisation de l'IL-6. De plus, l'absence de réponse du gène aux traitements par l'IL-1 et le TNF α est cohérente. En effet, ces deux cytokines conduisent à la production de NF- $\kappa\beta$ un facteur de transcription pour lequel nous n'avons pas trouvé de site de fixation dans les régions promotrices P_A et P_B de *ST6Gal II*. De plus, l'analyse des QTL présents sur le chromosome 11 (Figure 69) montre que *ST6Gal II* se situe dans une région du chromosome où ont été identifiés deux QTLs très intéressants. Le premier est défini comme étant impliqué dans la mammite clinique (CM : Clinical Mastitis) et le second dans la résistance générale aux pathologies (GDR : General Disease Resistance) (Figure 69). La taille exacte de ces QTL n'est toujours pas connue avec précision mais compte tenu de nos résultats expérimentaux il ne serait pas étonnant que *ST6Gal II* en fasse partie.

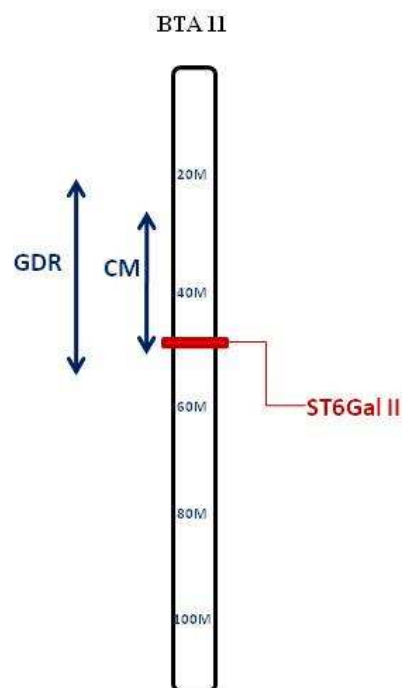


Figure 69 : Les QTLs associés à la réponse inflammatoire du chromosome 11. Représentation schématique du chromosome 11 bovin (BTA 11) dont l'échelle de mesure est indiquée en Méga paires de bases. Le rectangle rouge représente la localisation du gène *ST6Gal II* et les QTLs sont représentés par les flèches bleues (CM = Clinical Mastitis et GDR = General Disease Resistance)

Tous ces résultats sont plutôt encourageants mais il serait très intéressant de pouvoir les confirmer *in vivo*. Pour répondre à ces interrogations, nous planifions de comparer les niveaux d'expression de *ST6Gal II* entre des animaux sains et des animaux atteints de mammite. Par ailleurs, il sera intéressant d'identifier la présence des substrats affectés par la présence de ces niveaux d'expression

élevés de ST6Gal II. Pour ce faire, nous envisageons d'analyser les oligosaccharides et les protéines porteuses de motif LacdiNAc telle que CD36, une protéine des globules lipidiques du lait de vache qui peut être modifiée au cours de la réponse inflammatoire (Nakata *et al.*, 1993).

L'ensemble des travaux présentés ci-dessus ont donné lieu à la publication suivante, celle-ci étant jointe en annexe de ce manuscrit :

The second bovine β -Galactoside- α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II): genomic organization and stimulation of its *in vitro* expression by IL-6 in bovine mammary epithelial cells

Benoit Laporte, Sara Gonzalez-Hilarion, Abderrahman Maftah, and Jean-Michel Petit

Glycobiology Advance Access published on July 17, 2009

2. *FUT7* code une α 1,3-fucosyltransférase qui catalyse la biosynthèse de l'épitope Sialyl-Lewis^x chez le bovin

Cette deuxième partie des résultats concerne l'étude que nous avons menée sur le gène *FUT7* bovin. Comme nous l'avons précédemment introduit, notre équipe s'intéresse en partie à des pathologies pouvant atteindre les ruminants laitiers et qui peuvent avoir des répercussions directes sur la qualité et la quantité du lait produit par les vaches qui en sont atteintes. Cependant, comme pour toutes pathologies, certaines populations d'animaux semblent être plus résistantes que d'autres à ce type d'infection. En plus des constituants nutritifs qui le composent, le lait présente une certaine quantité de cellules sanguines de type globules blancs dont le nombre varie d'un individu à l'autre. Or il s'est avéré que le taux initial de ces cellules sanguines dans le lait pouvait être directement corrélé à la sensibilité des animaux aux pathologies. En effet, les bovins dont le lait renferme un taux élevé de leucocytes sont, d'une part plus sensibles à l'infection, et, d'autre part, développent des pathologies plus sévères (Rupp *et al.*, 2000). Le passage des leucocytes de la circulation sanguine vers la glande mammaire dépend en partie d'un épitope glucidique, l'antigène Sialyl-Lewis^x.

Cette structure a été étudiée chez plusieurs espèces, telles que l'homme et la souris, et chez lesquelles il a été montré que la fucosylation sur le carbone 3 de la N-acétylglucosamine appartenant à un motif Sialyl- α 2,3-lactosamine constituait l'étape finale de la voie de biosynthèse de l'antigène SLe^x. Cette fucosylation est réalisée par une α 1,3-fucosyltransférase codée par le gène *FUT7*. L'identification des gènes de fucosyltransférases étant bien moins avancée chez le bovin que chez l'homme et la souris, l'enzyme principalement responsable de la formation du Sialyl-Lewis^x n'était pas connue. Notre travail a donc consisté au clonage et à la caractérisation du gène *fut7* bovin et de son produit. Par ailleurs, *FUT7* est un gène monomorphe mais il a été montré chez l'homme (Bengtson *et al.*, 2001) qu'une mutation faux sens (G329A) avait pour conséquence un déficit plus ou moins sévère du recrutement leucocytaire au site inflammatoire. Sachant que la

présence de mutations dans un gène comme *FUT7* pouvait avoir des répercussions directes sur la physiologie de l'individu qui les porte, nous avons effectué une recherche de polymorphismes du gène *fut7b* dans plusieurs races bovines.

2.1. Clonage d'un ADNc codant pour la FUT7 bovine

La stratégie que nous avons choisie pour cloner *fut7b* est semblable à celle que nous avons utilisée pour cloner *bST6Gal II*. En effet, notre étude a commencé au début du séquençage du génome bovin et aucune information concernant ce gène n'était disponible. Ainsi, nous avons récupéré les séquences des ARNm humain (U11282) et murin (AAC52484) et nous les avons utilisés pour sonder les différentes banques de données existant alors, ceci dans le but d'identifier des séquences de fortes similitudes pouvant correspondre à *fut7b*. Cette analyse a été partiellement fructueuse puisqu'elle nous a permis de trouver un WGS (AAFC01684977) présentant respectivement 80% et 77% d'identité avec les 417 dernières paires de bases des séquences codantes humaine et murine.

La séquence de ce WGS nous a permis de déterminer un couple d'amorce que nous avons utilisé pour amplifier par PCR un fragment de 410 pb à partir d'ADNc de thymus et d'ADN génomique. Compte tenu de la forte teneur en G/C de cette séquence (69%), nous avons été confrontés à des problèmes d'amplification. En effet, celle-ci n'a pu avoir lieu qu'en présence d'une concentration finale de DMSO de 10% (v/v) dans le mélange réactionnel, les PCR réalisées sans DMSO ne permettant aucune amplification et celles où la concentration finale était de 5% (v/v) n'ayant révélées que des « smears » d'amplification (Figure 70). Les fragments obtenus ont ensuite été extraits du gel, introduits dans un vecteur d'amplification puis séquencés. Que ce soit à partir de l'ADN génomique ou des ADN complémentaires de thymus, les amplicons ont des séquences parfaitement identiques à celle du WGS et correspondraient bien à une partie de la séquence codante de *fut7b*.

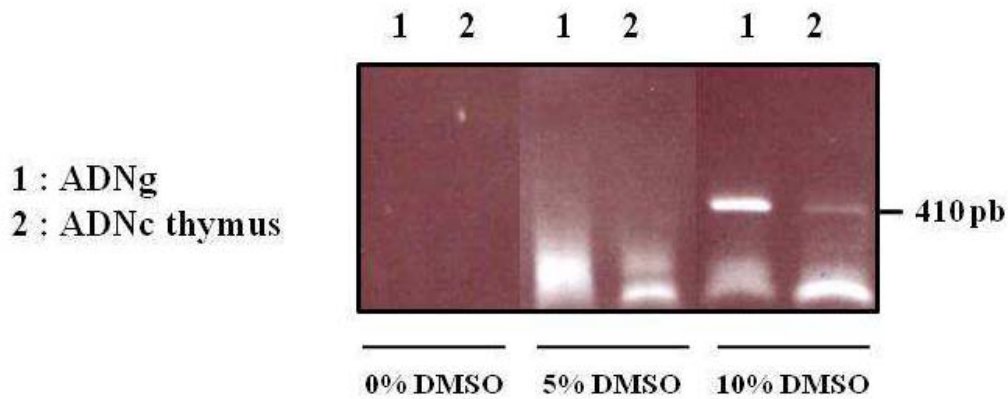


Figure 70 : Amplification de la séquence 3' codante du gène *fut7* bovin. Gels d'électrophorèse des PCRs d'amplification des 410 dernières paires de bases de la région codante de *fut7b* à partir d'ADNg (1) ou d'ADNc de thymus (2). Ces amplifications ont été réalisées sans ou avec une concentration finale en DMSO de 5 ou 10% (v/v) dans le mélange réactionnel.

Deux approches ont ensuite été utilisées pour cloner la partie manquante du gène. Dans un premier temps, n'ayant pas pu identifier une séquence homologue aux parties 5'-codantes des gènes humain et murin dans les banques de données bovines, nous avons essayé d'utiliser une amorce (*fut7bs2*) dont la séquence était bien conservée entre l'homme et la souris en association avec des amorces situées dans la région que nous venions de caractériser (Figure 71A). Nous avons ainsi pu amplifier à partir d'ADN génomique deux fragments mesurant respectivement 508 et 896 pb (Figure 71B). Les amplicons ont été séquencés et présentent 80% d'identité avec leurs homologues humain et murin.

Cependant, il ne nous a pas été possible de récupérer l'ensemble de la séquence codante par cette approche. De ce fait, nous avons mis en place un protocole de 5'-RACE (voir Matériels et méthodes 2.2.3. et 2.2.4.) à partir d'ADNc de thymus qui nous a permis d'amplifier un unique fragment de 542 paires de bases (Figure 71B). Cet amplicon a été séquencé et nous a permis de reconstituer l'ensemble du cadre ouvert de lecture du gène *fut7* bovin. Celui-ci est composé de 1029 paires de bases et présente 83% d'identité avec son homologue humain et 74% avec son homologue murin.

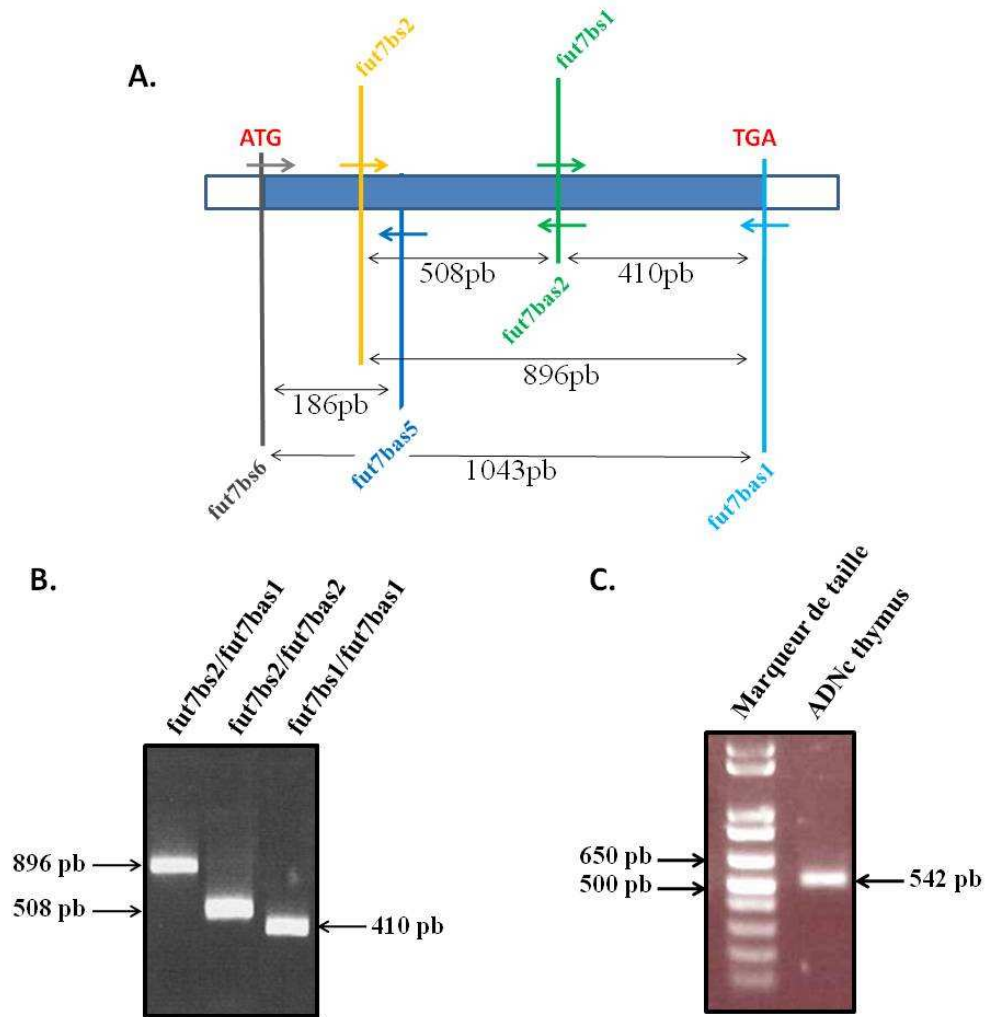


Figure 71 : Clonage de la région codante du gène *fut7* bovin. En A, représentation schématique de la région codante de *fut7b*. Les flèches indiquent la position et le sens des amorces utilisées lors du clonage. Les tailles des différents fragments amplifiés sont indiquées en paires de bases. En B, gel d'électrophorèse des PCR réalisées sur de l'ADNg avec les couples d'amorces *fut7bs2/fut7bas1* ; *fut7bs2/ fut7bas2* et *fut7bas1/fut7bas1*. En C, gel d'électrophorèse des produits d'amplification de 5'-RACE obtenus à partir d'ADNc de thymus.

2.2. Le gène *fut7b*

2.2.1. Organisation génomique

Les régions codantes des gènes de fucosyltransférases golgiennes sont pour la plupart contenues dans un seul exon, c'est notamment le cas de *FUT1* à *FUT6* ainsi que *FUT9* chez l'homme et la souris mais aussi celui de *futb* chez le bovin. L'une des exceptions à cette structure monoexonique du cadre de lecture concerne justement le gène *FUT7*. En effet, il est réparti sur deux exons chez

l'homme et trois chez la souris (Smith *et al.*, 1996). Ainsi, après avoir identifié la séquence de la région codante, nous avons voulu savoir si *fut7b* présentait, comme ses homologues, une structure morcelée. Que ce soit chez l'homme ou la souris, les régions introniques sont de petite taille. C'est pourquoi, notre stratégie a consisté à réaliser une PCR sur de l'ADN génomique avec des amorces permettant l'amplification de l'ensemble de la région codante y compris l'intron. Nous avons ainsi pu obtenir un fragment de 1135 paires de bases (Figure 72) qui, après séquençage, a révélé la présence d'une séquence intronique de 92 paires de bases. De plus, nous avons pu vérifier les jonctions exon/intron et mettre en évidence la présence des sites donneur et accepteur d'épissage.

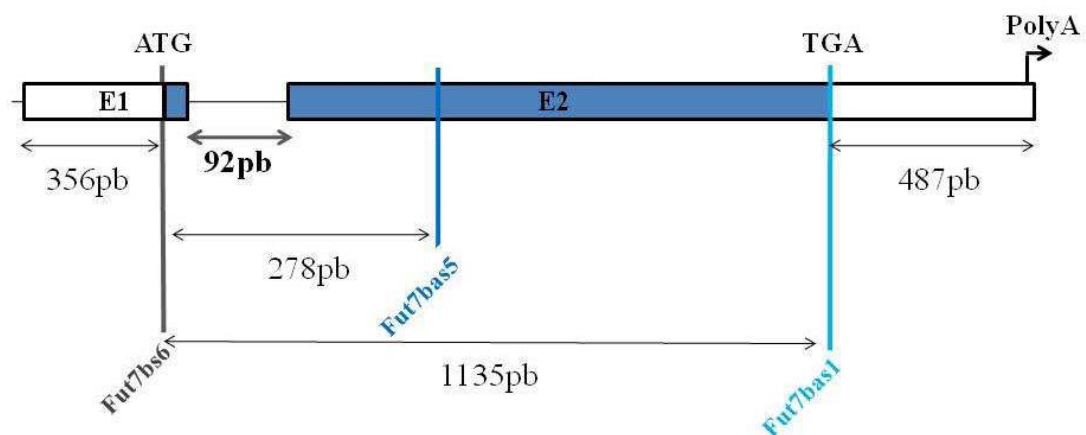


Figure 72 : Structure du gène *fut7* bovin. Représentation schématique du gène *fut7b* et des amplifiats qui ont permis de le localiser dans le génome. Les tailles sont indiquées en paires de bases (pb). PolyA indique la présence d'un site de polyadénylation.

En plus de nous avoir donné les informations manquantes sur la séquence codante, la 5'-RACE que nous avons réalisée lors de la dernière étape du clonage nous a également renseignés sur la région 5'-non traduite des transcrits de *fut7b* (Figure 71C). Ainsi, le fait que nous n'ayons trouvé qu'une seule région 5'-non traduite et qu'il n'y ait qu'une seule bande parfaitement isolée après l'amplification de la région codante à partir d'ADN génomique (Figure 72) tend à indiquer que le cadre de lecture du gène *fut7* bovin est réparti sur deux exons, E1 et E2. Enfin, une analyse complémentaire de la séquence laisse penser que l'exon E2 contient la totalité de la région 3'-non traduite du fait de la présence d'une séquence consensus de polyadénylation située 487 paires de bases en aval du codon STOP.

De manière générale, l'analyse comparative des gènes bovin, humain et murin montre que *FUT7* possède une structure qui a particulièrement bien été conservée au cours de l'évolution (Figure 73). En effet, à l'exception chez la souris de l'exon E1 non traduit et de l'exon E2 qui permet la production d'une forme longue de la protéine, les gènes de ces trois espèces ont des structures

identiques (pour la suite de l'analyse, nous ne parlerons pas des exons E1 et E2 murins). Le premier point remarquable est le découpage exon/intron de la région codante. Dans ces trois espèces, les exons E1 bovin et humain et l'exon E3 de souris contiennent systématiquement 13 pb codantes, les 1016 paires de bases restantes étant respectivement retrouvées sur l'exon E2 chez l'homme et le bovin et sur l'exon E4 chez la souris (Figure 73). Par ailleurs, le dernier exon codant de ces trois espèces contient également la totalité de la région 3'-non traduite des transcrits, la taille de cette dernière étant assez bien conservée et de l'ordre de 500 paires de bases. L'autre point commun facilement identifiable entre ces trois gènes est la taille des séquences introniques séparant les exons E1 et E2 de l'homme et du bovin et celle de l'intron séparant les exons E3 et E4 murins. Bien que ces 3 introns n'aient pas des tailles strictement conservées, ils sont tous de petite taille, le plus grand étant l'intron humain (253 paires de bases), l'intron bovin étant le plus petit avec ses 92 pb (Figure 73).

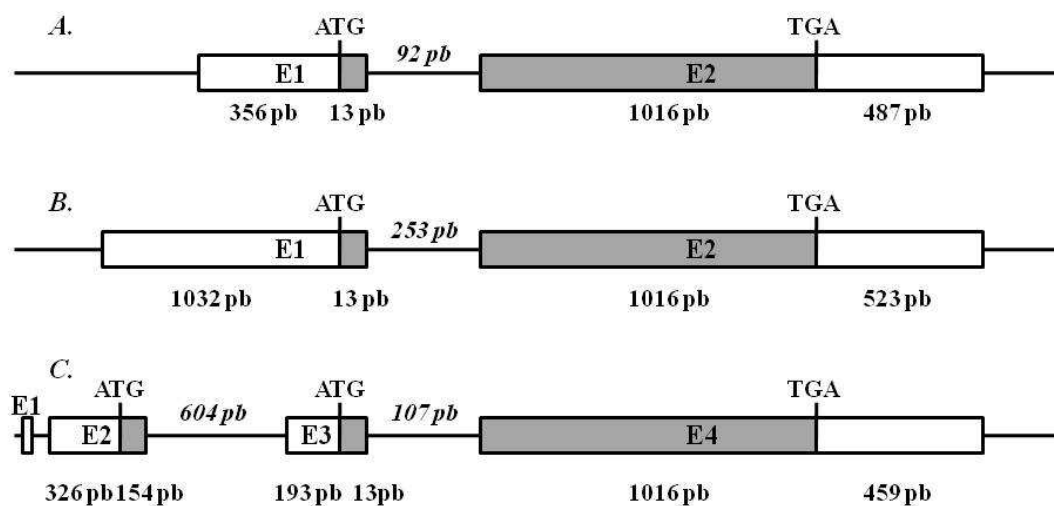


Figure 73 : Comparaison des organisations génomiques de *fut7* bovin (A), *FUT7* humain (B) et *fut7* murin (C). Les séquences codantes des exons sont représentées par des rectangles gris et les séquences non traduites par des rectangles blancs. Les introns sont représentés par des traits. Les tailles de chacune des régions sont exprimées en paires de bases.

2.2.2. Localisation chromosomique

Après avoir établi l'organisation génomique de *fut7b*, nous avons voulu le positionner au sein du génome bovin. Notre première approche a consisté à prendre la séquence codante du gène et à l'utiliser pour sonder *in silico* les banques d'ADN génomique bovin. Cependant et malgré les avancées du séquençage, il nous a toujours été impossible de positionner *fut7b* dans le génome.

Ainsi, afin de déterminer la localisation exacte du gène, nous avons mis en place un protocole en deux étapes. Sachant que le gène *FUT7* humain est situé sur le chromosome 9 entre les bases 139044447 et 139047287, nous avons réalisé une analyse des blocs de syntenie de ce chromosome par rapport au génome bovin. Nos résultats montrent que le HSA9 humain regroupe majoritairement des régions chromosomiques du BTA8 mais également quelques portions des chromosomes BTA4, 17, 21 et 27. Enfin, la région télomérique du bras long de HSA9, qui porte le gène *FUT7*, correspond à la région télomérique du BTA11 (Figure 74). Ces données suggèreraient que *fut7b* est situé dans la région télomérique du chromosome BTA11 sans pour autant pouvoir clairement l'affirmer et le situer (Figure 74).

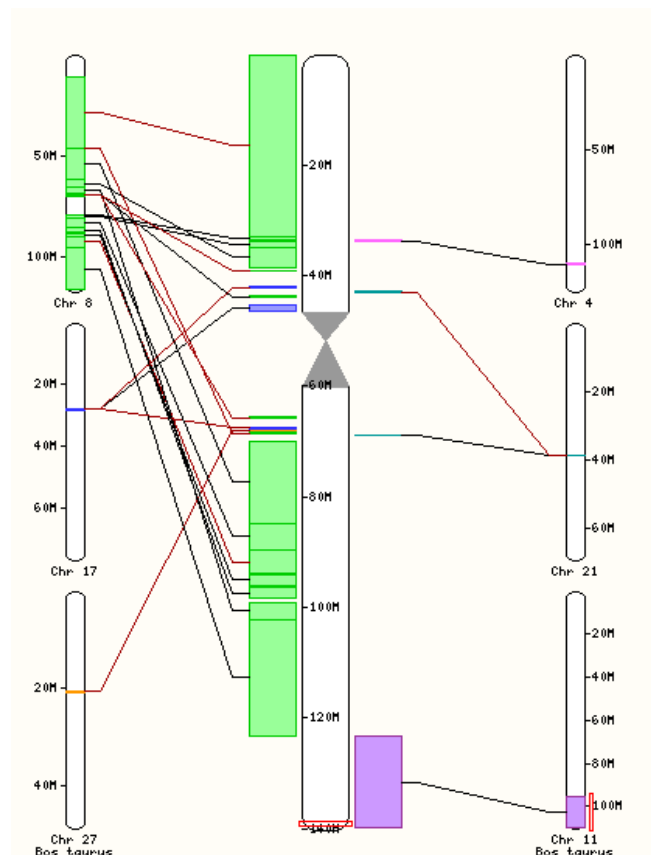


Figure 74 : Analyse des groupes de syntenie du chromosome 9 humain (HSA9) par rapport au génome bovin. Les rectangles blancs centraux représentent le chromosome HSA9, le rectangle rouge l'emplacement du gène *FUT7* (région télomérique). L'échelle de taille employée pour l'ensemble des chromosomes représentés est le « million de paires de bases » (M). Les zones représentées en vert correspondent aux régions orthologues entre HSA9 et BTA8, les zones bleues foncé entre HSA9 et BTA17 et la zone violette à celle entre HSA9 et BTA11. Les traits bleus clair représentent les régions orthologues entre HSA9 et BTA21, le trait rose à celle entre HSA9 et BTA4, le trait orange à celle entre HSA9 et BTA27. Les lignes reliant les chromosomes bovins au chromosome humain représentent les inversions géniques observées entre ces deux espèces.

La localisation chromosomique n'a pu réellement être déterminée qu'en utilisant un panel d'hybrides de radiation (Williams *et al.*, 2002 ; Jann *et al.*, 2006). Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. André Eggen (alors à l'INRA, Jouy en Josas). L'amplification

par PCR à partir de ce panel d'un fragment de 278 paires de bases grâce au couple d'amorces *fut7bs6/fut7bas5* (Figure 72) a permis de confirmer la localisation du gène *fut7b* dans la région télomérique du chromosome BTA11. De manière plus précise, il a pu être montré que ce gène était lié aux marqueurs microsatellites BMS1350 et RSJW577, respectivement localisés aux positions 10643052 et 105989967 du BTA11.

2.2.3. La protéine FUT7 bovine

Le cadre de lecture du gène *fut7b* code potentiellement pour une protéine de 342 acides aminés. L'analyse du profil d'hydropathie réalisé à partir de sa structure primaire montre qu'il existe une seule région suffisamment hydrophobe pour correspondre à un segment transmembranaire (Figure 75). Ainsi, chez le bovin, FUT7 a une structure de protéine transmembranaire de type II et se compose d'un court domaine N-terminal de 14 acides aminés, d'une région transmembranaire de 19 acides aminés et d'une grande région C-terminale de 309 acides aminés regroupant région tige et domaine catalytique.

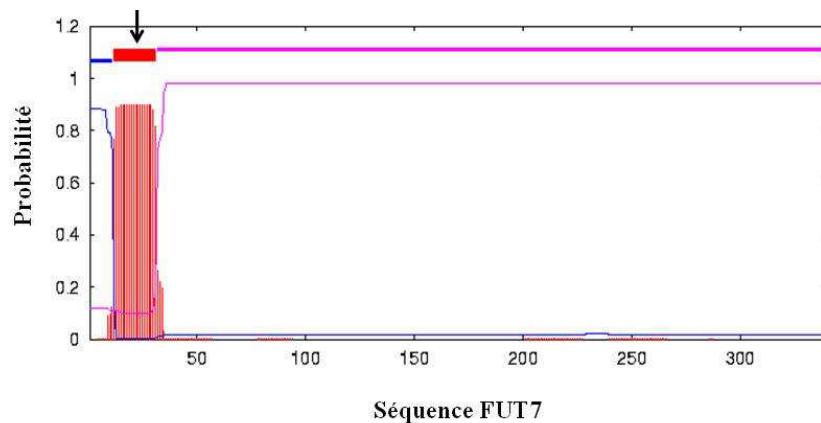


Figure 75 : Analyse du profil d'hydropathie de FUT7. Graphique obtenu avec le programme TMHMM d'Expasy. La zone représentée en rouge et indiquée par une flèche correspond au domaine transmembranaire de la protéine. Le trait bleu indique la partie N-terminale, le trait rose la région C-terminale catalytique.

L'alignement de la séquence bovine de FUT7 avec ses homologues humain et murin nous a permis de constater que ces fucosyltransférases présentent entre elles de très fortes ressemblances (Figure 76). En effet, la séquence bovine partage 79% de ses acides aminés avec la séquence humaine, 74% avec la séquence courte murine et 65% avec la forme longue, ce moindre taux d'identité étant provoqué par les 47 acides aminés supplémentaires de la région cytosolique de la forme longue murine. Par ailleurs, nous avons pu retrouver dans le domaine catalytique de la protéine bovine les 5 motifs conservés des α 3,4-fucosyltransférases (Figure 76), les motifs I à III étant impliqués dans

Enfin, notons qu'il existe deux sites potentiels de *N*-glycosylation aux positions 81 et 291 de la séquence primaire de la protéine bovine, ces 2 sites étant également parfaitement conservés chez l'homme et la souris (Figure 76).

2.3. Expression tissulaire du gène *fut7b*

Une fois la structure du gène déterminée, nous avons voulu préciser son profil d'expression tissulaire. Compte tenu du faible niveau d'expression des fucosyltransférases, nous avons opté pour une approche de RT-PCR. Le gène *fut7b* étant morcelé, nous avons pu choisir des amorces situées sur chacun des deux exons et permettant l'amplification d'un fragment de 186 paires de bases, ce choix d'amorces ayant pour but de se prémunir contre d'éventuelles contaminations de la préparation d'ADNc par de l'ADN génomique. Par ailleurs, nous nous sommes assurés de la qualité de la préparation de nos ADNc en effectuant une PCR sur un gène de ménage, en l'occurrence le gène codant la GAPDH.

Nos résultats révèlent un profil d'expression tissulaire assez restreint. En effet, parmi les tissus que nous avons testés, les transcrits *fut7b* sont retrouvés dans le thymus, le poumon, la rate et le foie mais leur expression n'a pas pu être mise en évidence au niveau du cerveau, de la glande mammaire, du colon et du rein (Figure 77). D'un point de vue quantitatif, le thymus est le tissu exprimant le plus *fut7b*, son niveau d'expression étant moins important dans la rate et le foie bien qu'il y soit encore assez fortement exprimé. Enfin, de tous les tissus où nous avons détecté la présence de *fut7b*, le poumon apparaît être celui qui présente le taux de transcription le plus faible.

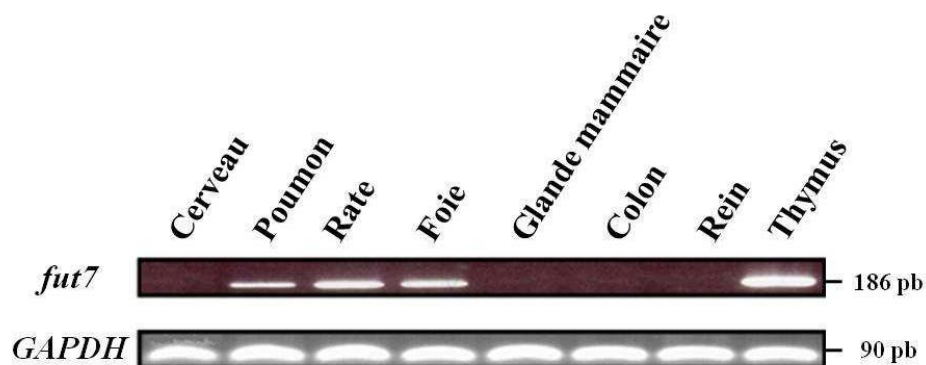


Figure 77 : Profil d'expression tissulaire du gène *fut7b*. Ce profil a été déterminé en utilisant la RT-PCR sur des ARN de 8 tissus bovins différents. Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique, les amorces sens (*fut7bs4*) et anti-sens (*fut7bas5*) ont été choisies dans deux exons différents. Le fragment amplifié est alors de 186 pb. L'amplification d'un fragment de 90 pb du gène de la GAPDH a servi de contrôle qualité de la préparation d'ADNc.

Par ailleurs, les régions 5'-UTR des transcrits de *fut7b* au niveau du poumon, de la rate et du foie sont identiques à celle du thymus ; ces résultats confirmant la structure préalablement établie du gène en deux exons.

2.4. Spécificité de substrat de FUT7 bovine

Une fois la caractérisation de l'organisation génique et du profil d'expression tissulaire réalisée, nous avons voulu déterminer quelles étaient les propriétés enzymatiques de la fucosyltransférase qu'il code. Pour ce faire, nous avons décidé de produire la FUT7 bovine sous forme de protéine recombinante dans les cellules COS-1, ces dernières possédant l'antigène T nécessaire à la synthèse transitoire des protéines recombinantes. Notre travail a débuté par l'amplification d'un ADNc contenant le cadre ouvert de lecture à partir d'un « pool » d'ADNc de thymus. Cet ADNc a été dans un second temps inséré dans le vecteur d'expression pFlag CMV-2 et c'est cette construction qui a été utilisée pour transfecter les cellules COS-1. L'activité de la FUT7 bovine recombinante a ensuite été testée sur 5 arylglycosides : Type I-octyl (Gal β 1,3GlcNAc-octyl), Sialyl-Type I-octyl (Sia α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-octyl), Type II-octyl (Gal β 1,4GlcNAc-octyl), H-type II-octyl (Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc-octyl) et Sialyl-Type II-octyl (Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-octyl) (Tableau IX).

Tableau IX : Activité des α 3-fucosyltransférases bovines recombinantes FUT7b, FUT4b* et FUT9b* produites dans les cellules COS-1. Les arylglycosides ont été utilisés à une concentration finale de 1 mM et le taux de transfert des fucosyltransférases est exprimé en pmol de fucose transféré par heure et par mg de protéines.

Accepteurs	FUT7b	FUT4b	FUT9b
Gal β 1-3GlcNAc-octyl	0	ND	ND
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc	0	ND	ND
Gal β 1-4GlcNAc-octyl	40	885	904
Fuc α 1,2 Gal β 1,4GlcNAc	0	987	1068
NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	1108	201	43

* d'après Thèse C. Javaud (2002) ; ND : non déterminé

Le fait que nous ayons détecté une activité sur deux des cinq accepteurs nous prouve d'une part que l'enzyme a bien été produite, et, d'autre part, que celle-ci est bien capable de transférer le fucose sur un substrat oligosaccharidique. Parmi les oligosaccharides que nous avons utilisés, nos données expérimentales indiquent que la FUT7 bovine a comme substrat accepteur préférentiel le Sialyl-Type II (Tableau IX). En effet, en présence d'un acide sialique sur l'oligosaccharide, l'activité de transfert du fucose est environ 25 fois plus importante que celle observée sur le Type II-octyl. Par

ailleurs, l'absence totale d'activité fucosyltransférase sur le H-type II-octyl tend à prouver que FUT7 n'est pas capable de former d'antigènes di-fucosylés. Enfin, nos résultats mettent en évidence le fait que FUT7 est une α 3-fucosyltransférase stricte, aucune activité n'ayant pu être détectée sur les oligosaccharides de Type I (Tableau IX).

2.5. Etude du polymorphisme de *fut7b*

Notre étude de *fut7b* s'est achevée par une recherche de polymorphisme du gène dans sa partie codante. Nous avons ainsi analysé le génome de 30 animaux provenant de 6 races différentes : Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Holstein, Limousine, Montbéliarde et Normande. Pour chacun d'eux, quatre fragments permettant de recouvrir l'ensemble de la séquence codante ont été amplifiés par PCR (Figure 71 ; Tableau X), introduits dans un vecteur d'amplification puis séquencés.

Tableau X : Liste des différents fragments amplifiés pour la recherche de polymorphismes de *fut7b*

Amplicons	Amorces Sens	Amorces Anti-sens	Taille de l'amplifiât (pb)
A	<i>Fut7bs6</i>	<i>Fut7bas5</i>	278*
B	<i>Fut7bs1</i>	<i>Fut7bas1</i>	410
C	<i>Fut7bs2</i>	<i>Fut7bas1</i>	896
D	<i>Fut7bs2</i>	<i>Fut7bas2</i>	508

*correspond au fragment de 277 paires de bases indiqué dans la Figure 72

Cette méthodologie nous a permis d'identifier 7 sites polymorphes respectivement localisés au niveau des bases 58, 95, 213, 335, 501, 792 et 831 du cadre ouvert de lecture de *fut7b* (Tableau XI). Parmi ces sept SNPs, seuls les polymorphismes retrouvés au niveau des bases 58, 95 et 335 induisent un changement de la séquence protéique, les 4 autres (213, 501, 792 et 831) étant tous assimilés à des mutations silencieuses. La mutation de la base 58 a été retrouvée à une fréquence de 16,5 % et principalement à l'état hétérozygote (4 individus contre 1). Elle est présente chez la Blonde d'Aquitaine, la Charolaise, la Montbéliarde et la Normande mais est absente chez la Holstein et la Limousine. La substitution G→A induit l'apparition d'une méthionine à la place de la valine 20 (Tableau XI), celle-ci étant localisée au niveau de la région N-terminale cytosolique. La mutation de la base 95 n'a été mise en évidence que pour un seul individu de race Charolaise et à l'état homozygote. Ce polymorphisme consiste également à la substitution d'une guanine en

adénine et conduit à l'apparition d'une glutamine à la place d'une arginine en position 32 (Tableau XI). Elle se situe donc à la jonction du domaine transmembranaire et de la région tige.

Tableau XI : Les différents SNPs de la séquence codante de *fut7b*. L'analyse polymorphique a été réalisée sur 6 races bovines, trois races à viandes (Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine), une race laitière (Holstein) et deux races mixtes (Montbéliarde et Normande). Pour chaque race, les génomes de 5 individus ont été étudiés. La dernière ligne du tableau rend compte des modifications induites par les différents polymorphismes au niveau de la séquence protéique.

		Localisation des polymorphismes dans la séquence codante du gène <i>fut7b</i>						
Race	Individu	base 58	base 95	base 213	base 335	base 501	base 792	base 831
Séquence référence	-	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Blonde d'Aquitaine	BA14	A/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Blonde d'Aquitaine	BA30	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Blonde d'Aquitaine	BA32	A/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/T
Blonde d'Aquitaine	BA33	G/G	G/G	C/C	A/G	G/G	C/C	C/C
Blonde d'Aquitaine	BAX	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Charolaise	CHA2	G/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Charolaise	M5	N/N	N/N	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Charolaise	M7	G/G	G/G	T/T	A/A	G/G	C/C	C/C
Charolaise	M9	G/G	G/G	T/T	A/A	G/G	C/C	C/C
Charolaise	M11	A/A	A/A	C/C	G/G	G/G	C/C	C/T
Holstein	H1 [425008]	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Holstein	H2 [425009]	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Holstein	H3 [425010]	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Holstein	H4 [425011]	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Holstein	H5 [425012]	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Limousine	LIM1	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Limousine	LIM2	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C
Limousine	LIM3	G/G	G/G	C/C	G/G	G/C	G/C	C/C
Limousine	LIM4	G/G	G/G	C/C	A/G	G/G	C/C	C/C
Limousine	LIM5	G/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Montbéliarde	M6 [425019]	G/G	G/G	T/T	G/G	G/G	C/C	C/C
Montbéliarde	M7 [425020]	G/G	G/G	T/T	A/A	G/G	C/C	C/C
Montbéliarde	M8 [425021]	G/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Montbéliarde	M9 [425022]	A/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Montbéliarde	M10 [425099]	G/G	G/G	C/T	G/G	G/G	G/C	C/C
Normande	N11 [425023]	G/G	G/G	C/T	G/G	G/G	C/C	C/C
Normande	N12 [425024]	A/G	G/G	C/T	G/G	G/G	C/C	C/C
Normande	N13 [425281]	G/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Normande	N14 [425312]	G/G	G/G	T/T	A/G	G/G	C/C	C/C
Normande	N16 [425322]	G/G	G/G	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C

Modifications de la séquence de FUT7	20 ^e a.a; V→M	32 ^e a.a; R→Q	Aucune	112 ^e a.a; R→Q	Aucune	Aucune	Aucune
--------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	--------	------------------------------	--------	--------	--------

Enfin, le dernier SNP conduisant à une modification de la séquence protéique se situe au niveau de la base 335 de la séquence codante. Ce polymorphisme est assez fréquent puisque nous l'avons identifié pour 40% des individus de notre panel. Là encore, ce SNP consiste à la substitution d'une

guanine par une adénine. Elle est principalement retrouvée sous forme hétérozygote et n'a été retrouvée sous forme homozygote que chez la Montbéliarde et la Charolaise (Tableau XI). Par ailleurs, il est intéressant de noter que ce SNP n'a pas été mis en évidence chez la race laitière Holstein. La conséquence de ce polymorphisme est l'apparition d'une glutamine à la place de l'arginine 112. Cet acide aminé étant situé juste avant le motif III des α 3/4-fucosyltransférases, ce SNP pourrait induire une altération des propriétés enzymatiques de l'enzyme.

2.6. Discussion

2.6.1. Analyse du gène *fut7b*

Au cours de ce travail, nous avons cloné un ADNc qui code pour l'homologue bovin des enzymes FUT7 humaine et murine. Le gène dont il est issu, que nous avons dénommé *fut7b*, a pu être positionné au niveau de la région télomérique du chromosome BTA11. Ce gène partage une organisation tout à fait identique à celle du gène humain en plus de présenter un taux d'identité de séquence très élevé au niveau de la région codante, ces deux éléments étant des arguments forts qui rendent compte de la conservation du gène *FUT7* au cours de l'évolution. Pour entrer dans le détail, tout comme le gène humain, *fut7b* est constitué de deux exons, E1 et E2, avec un cadre ouvert de lecture réparti sur chacun d'entre eux. De plus, le découpage exon/intron est parfaitement respecté. En effet, que ce soit chez l'homme ou le bovin, l'exon E1 est majoritairement constitué de séquence non traduite mais contient les 16 premières paires de bases de la séquence codante, les 1016 dernières paires bases étant portées par l'exon E2 (Figure 73). La comparaison ne s'arrête pas là et s'étend à la séquence intronique qui sépare les exons E1 et E2 de ces deux espèces. Ceux-ci sont de petite taille, 253 paires de bases chez l'homme et 92 chez le bovin. La structure du gène murin présente également de nombreuses similitudes avec ses homologues, toutes les caractéristiques que nous avons précédemment décrites étant transposables aux exons E3 et E4 et à l'intron qui les sépare (Figure 73). Cependant, chez la souris, la structure du gène est plus complexe puisque celui-ci possède deux exons supplémentaires, un exon non codant (E1) et un exon codant (E2) qui permet d'initier la traduction d'une forme longue de la FUT7 murine (Smith *et al.*, 1996). Enfin, chez ces trois espèces, le dernier exon codant renferme également l'ensemble de la séquence 3'-non traduite. La taille de cette région 3'-UTR est bien conservée et se situe aux alentours de 500 paires de bases.

Les similitudes que nous avons observées au niveau génique se répercutent sur la structure des protéines potentiellement codées par ces gènes. En effet, l'enzyme FUT7 bovine adopte à l'instar de ses homologues humaine et murine une structure de glycoprotéine transmembranaire de type II et possède dans son domaine catalytique C-terminal les 5 motifs signatures des α 3/4-fucosyltransférases. Notons qu'au niveau de ces motifs, les enzymes humaine et bovine présentent 97% d'identité de séquence. Enfin, toutes ces enzymes possèdent deux sites potentiels de *N*-glycosylation parfaitement conservés. Cependant, ni leur taux d'occupation ni leur importance dans le processus catalytique n'ont été jusqu'à présent étudiés.

2.6.2. Propriétés enzymatiques de FUT7b

Durant cette étude, nous avons pu obtenir une forme recombinante de l'enzyme FUT7 bovine. Celle-ci s'est révélée être capable de transférer du fucose sur des structures oligosaccharidiques à partir d'un substrat donneur activé, le glycosylnucléotide GDP-Fuc (Tableau IX). Grâce à elle, nous avons pu préciser les spécificités de substrat accepteur de cette fucosyltransférase et rendu compte de sa très nette voire exclusive préférence pour la Sialyl-lactosamine, l'activité de transfert sur le LacNAc étant quasiment inexistante (Tableau IX). De plus, l'absence totale de transfert sur des oligosaccharides de Type I indique très clairement que l'enzyme n'a pas la capacité de former de liaison Fuc α 1,4GlcNAc et qu'elle est, à l'instar de son homologue humaine (Sasaki *et al.*, 1994), une α 3-fucosyltransférase stricte. Ce résultat est un nouvel exemple validant l'importance du motif II des α 3/4-fucosyltransférases dans le déterminisme de la liaison formée par la fucosyltransférase. Par ailleurs, FUT7b ne peut pas greffer le fucose sur le H-type-II. Elle ne peut donc pas former les antigènes di-fucosylés. De ce fait, il est très intéressant de noter que cette enzyme a des propriétés antagonistes à celles de FUT4b et FUT9b (Tableau IX). En effet, ces dernières présentent des activités de transfert élevées sur la lactosamine et le H-Type II mais n'auront qu'une faible (FUT4b) ou une infime (FUT9b) activité sur la Sialyl-lactosamine (Tableau IX). Ainsi, FUT7 apparaît comme l'enzyme bovine principalement responsable de la synthèse de l'antigène SLe^x, bien que FUT4 semble pouvoir également former cet antigène.

L'analyse comparative des spécificités de substrats de ces trois fucosyltransférases bovines avec leurs homologues humaines est particulièrement intéressante, enzymes bovines et humaines

présentant des caractéristiques très similaires. En effet, l'enzyme FUT7 humaine a comme seul substrat la Sialyl-lactosamine (Cailleau-Thomas *et al.*, 2000), FUT4 préfère utiliser la lactosamine non sialylée (Easton *et al.*, 1993) alors que FUT9 n'a pas la capacité d'utiliser les structures sialylées de type II (Nishihara *et al.*, 1999). Ces données montrent à quel point la famille des α 3-fucosyltransférases a été conservée au cours de l'évolution, tant dans leurs séquences que dans leurs propriétés enzymatiques, ceci amenant à penser que les fonctions qu'elles occupent sont particulièrement importantes.

2.6.3. Expression tissulaire du gène *fut7b*

Chez l'homme, *FUT7* est un gène dont le profil d'expression tissulaire est restreint au thymus, à la rate et aux leucocytes (Kaneko *et al.*, 1999). Ce profil d'expression est cohérent avec la fonction associée à l'antigène SLe^x qu'elle forme, ce dernier étant principalement impliqué dans le recrutement des cellules leucocytaires aux sites inflammatoires et dans leur processus de domiciliation dans les organes lymphoïdes. Pour notre part, nous avons détecté l'expression de *fut7b* dans le thymus, la rate, le foie et le poumon, et, là encore, nous observons une certaine ressemblance entre le bovin et l'homme. La présence de *fut7b* dans le thymus et la rate, qui sont les tissus où il est le plus fortement exprimé, n'est pas surprenante. En effet, ces deux organes sont des organes lymphoïdes très importants où beaucoup de cellules leucocytaires sont retrouvées. En revanche, l'expression de *fut7b* au niveau hépatique est une spécificité bovine qui ne se retrouve ni chez l'homme ni chez la souris mais dont la présence peut tout de même s'expliquer par le fait que le foie participe à la dégradation des leucocytes vieillissants. L'expression du gène bovin dans les poumons est plus difficile à interpréter. Jusqu'alors, l'expression de *FUT7* et l'apparition du SLe^x au niveau pulmonaire est associée chez l'homme à une réponse inflammatoire (Groux-Degroote *et al.*, 2008), au développement tumoral (Mizuguchi *et al.*, 2007) ou à la cicatrisation (Allahverdian *et al.*, 2006). Or, les individus sur lesquels nous avons effectué cette étude d'expression tissulaire ne sont pas connus pour présenter de tels états physiologiques et nos résultats sont reproductibles d'un individu à l'autre. Ainsi, il se peut que l'expression de *fut7* chez le bovin soit nécessaire à une fonction, de cohésion tissulaire par exemple, qui n'existe pas chez l'homme. D'un point de vue plus critique de nos résultats, il se pourrait également que cette expression soit la conséquence de notre protocole d'extraction des ARNm. En effet, l'extraction des ARN totaux s'effectue à partir d'un morceau de tissu directement prélevé sur l'animal. Il se peut donc que notre prélèvement soit hétérogène et que le signal que nous observons provienne par exemple de cellules leucocytaires

présentes dans la muqueuse bronchique. A l'heure actuelle, aucune de ces possibilités ne peut être exclue. Compte tenu du niveau d'expression non négligeable de *fut7b* dans le poumon, il serait intéressant d'approfondir son étude dans ce tissu et d'identifier s'il en a une sa fonction physiologique.

Outre ce profil d'expression tissulaire assez restreint, nous n'avons identifié qu'un seul type de transcrit pour *fut7b*. En effet, dans les quatre tissus qui expriment le gène (foie, rate, thymus et poumon), tous les transcrits présentent la même séquence de 356 paires de bases au niveau de leur région 5'-UTR qui correspond à la séquence non traduite de l'exon E1. Le fait qu'il n'y ait qu'un seul type de transcrit nous laisse fortement penser que la transcription de *fut7b* dépend d'une seule région promotrice située en amont de l'exon E1. Nous cherchons actuellement à caractériser cette région promotrice dans le but de mieux comprendre la façon dont le gène est régulé chez le bovin. Ce résultat permet une nouvelle fois de faire le rapprochement avec le gène humain qui présente lui aussi une région promotrice située en amont de l'exon E1 et qui a l'originalité de posséder des sites de fixation pour des facteurs de transcription antagonistes, T-bet et GATA-3. Il a ainsi pu être démontré que l'ensemble des interactions existant entre ces deux facteurs de transcription est à la base d'une régulation très fine de l'expression de *FUT7* lors de la domiciliation des lymphocytes T (Chen *et al.*, 2006). Si la région promotrice bovine est régulée de la même manière, il est tout à fait envisageable de penser que des mutations de celle-ci pourraient avoir des conséquences sur l'adressage des cellules leucocytaires dans les tissus.

2.6.4. Analyse polymorphique du gène

Alors que certains gènes de fucosyltransférases chez l'homme tels que *FUT1* (Storry *et al.*, 2006), *FUT2* (Koda *et al.*, 2003), *FUT3* et *FUT6* (Soejima et Koda, 2005) présentent un taux élevé de polymorphismes, *FUT4* est monomorphe et *FUT7* très peu polymorphe. Cette absence de polymorphisme tend à conforter le fait que les fonctions associées aux fucosyltransférases qu'ils codent sont essentielles à la physiologie. Ainsi, nous avons voulu savoir si le gène *fut7b* présentait lui aussi cette même absence de polymorphisme. Pour ce faire, nous avons analysé un panel de 30 individus répartis dans 6 races bovines différentes (Tableau XI). De façon surprenante et contrairement au gène humain, nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude l'existence d'un fort polymorphisme. En effet, 7 SNP de type substitution ont été identifiés à partir de seulement 30 animaux. Parmi ces différents SNP, seuls trois (G58A, G95A et G335A) conduisent à

une modification de la séquence protéique (Tableau XI). Du point de vue de la répartition raciale de ces SNP, la mutation G58A a été mise en évidence chez la Blonde d'Aquitaine, la Charolaise, la Montbéliarde et la Normande, la substitution G95A n'a été détectée que chez la Charolaise et la mutation G335A dans toutes les races à l'exception de la Holstein. Il est d'ailleurs particulièrement intéressant de noter que les vaches Holstein, seule race laitière à proprement parlé, ne présentent aucun des 7 polymorphismes que nous avons pu identifier dans la région codante de *fut7b*. Cependant, compte tenu du faible nombre d'individus analysés par race, il nous apparaît difficile de déterminer de façon précise la fréquence d'apparition de chaque polymorphisme au sein d'une race.

Compte tenu de ces résultats, nous envisageons d'étudier d'un point de vue fonctionnel les conséquences des ces trois SNP et principalement la mutation G335A, comparable à la mutation G329A humaine (Bengtson *et al.*, 2001). En effet, ces deux mutations transforment des arginines (R), situées quelques acides aminés en amont du motif III des α 1,3-fucosyltransférases, en glutamines (Q). Chez l'homme, il a été montré que ce changement R→Q conduit à une inactivation de l'enzyme, celle-ci ayant comme conséquence, pour les individus porteurs à l'état homozygote de la mutation, du développement accru de pathologies telles que l'ulcère ou le diabète (Bengtson *et al.*, 2001). Ainsi, il nous semble important d'étudier les effets de cette mutation chez le bovin d'autant plus qu'elle a été retrouvée chez 40% des individus testés dont près d'un tiers la présente à l'état homozygote. L'étude de la mutation G95A présente elle aussi de l'intérêt. En effet, elle se caractérise par un changement R→Q à la toute fin du domaine transmembranaire. Il serait donc intéressant de déterminer si cette substitution pourrait avoir une incidence sur la localisation de l'enzyme dans l'appareil de Golgi et donc sur les cibles de la fucosyltransférase.

3. Implication des oligosaccharides du lait dans la résistance aux agents infectieux chez les ruminants laitiers

Ce dernier chapitre des résultats a pour but de présenter l'état d'avancement de nos travaux dans l'étude du rôle protecteur des oligosaccharides libres du lait vis-à-vis des pathogènes. En effet, les ruminants laitiers développent assez fréquemment des pathologies de la glande mammaire qui sont un réel problème pour le producteur.

Lors de notre étude sur le gène *fut7b* dont le produit participe à l'adressage tissulaire des leucocytes, nous n'avons pas eu le temps d'établir l'incidence de ce gène dans le déterminisme du taux leucocytaire dans le lait. Cependant, notre travail sur *ST6Gal II* nous a permis de démontrer que la sialyltransférase qu'il code joue un rôle lors de la réponse inflammatoire et qu'elle a pour substrat préférentiel les oligosaccharides libres. De plus, il a été démontré que les oligosaccharides libres du lait de femme ont un rôle protecteur vis-à-vis des pathogènes (Newburg *et al.*, 2005). Fort de ces informations, nous nous sommes demandés s'il pouvait exister des différences dans le panel d'oligosaccharides libres du lait entre les populations sensibles et résistantes à l'infection. Malheureusement, nous n'avons pas pu disposer d'échantillons de lait bovins d'individus sensibles et résistants. Cependant, le département de génétique animale de l'INRA disposant de deux cheptels ovins représentatifs de ces deux populations, nous avons décidé de mener notre étude sur le lait de brebis. Ce choix a été motivé par le fait que le bovin et l'ovine sont des espèces évolutivement proches et que nous avons pu déterminer qu'il y avait plus de 95% d'identité de séquence entre la *fut7* bovine et la *fut7* ovine. L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie ont été réalisés à l'UMR 8576 CNRS-Université de Lille 1 avec l'aide du Dr. Yann Guéraradel.

3.1. Purification des oligosaccharides libres des échantillons de lait

Pour mener notre analyse, nous disposions de deux échantillons de lait de brebis à faible taux de cellules sanguines (échantillons 40078 et 40127) et de deux échantillons à fort taux de cellules sanguines (échantillons 40218 et 40362). Pour chacun d'entre eux, les constituants les plus lourds du lait (cellules, acides gras, protéines) ont été culotés par centrifugation et le surnageant récupéré, ce dernier contenant la fraction oligosaccharidique libre. Cependant, cette étape de centrifugation ne suffit pas pour éliminer les petites molécules de type glycopeptides. Ainsi, pour ne récupérer que les oligosaccharides libres, nous avons effectué une chromatographie d'échange d'anions (Dowex 50x2 ; Matériel et méthodes 2.4.5.2.). Cette colonne fixe les glycopeptides et laisse passer les oligosaccharides libres lors de l'élution avec de l'eau.

Nous avons ensuite recherché qu'elles étaient les fractions collectées contenant les oligosaccharides libres. Pour cela, nous avons directement déposé sur plaque de silice un échantillon de chaque éluât et effectué une révélation à l'orcinol sulfurique. Pour l'échantillon 40078, nous avons récupéré les fractions 8 à 25 (Figure 78A), les fractions 9 à 32 pour l'échantillon 40127, les fractions 12 à 40 pour l'échantillon 40218 et les fractions 17 à 34 pour l'échantillon 40362. Pour chaque échantillon, les fractions oligosaccharidiques ont été regroupées ensemble et le pH ramené à la neutralité par ajout d'ammoniac. Il est impératif de ramener à pH neutre les solutions car les pH acides provoquent la perte des acides sialiques.

Par la suite, nous avons effectué une chromatographie couche mince (CCM) des fractions oligosaccharidiques. Les échantillons, dilués ou non, ont été déposés en présence de lactose et de gynolactose, ce dernier témoin contient plus de 130 oligosaccharides et correspond à l'ensemble des oligosaccharides du lait de femme à l'exception du lactose. Les profils de migration des oligosaccharides des quatre échantillons sont identiques et montrent que le lactose est de très loin l'oligosaccharide majoritaire du lait de brebis (Figure 78B), ce qui rend l'analyse structurale des autres oligosaccharides impossible. Nous avons donc dû l'éliminer de nos échantillons.

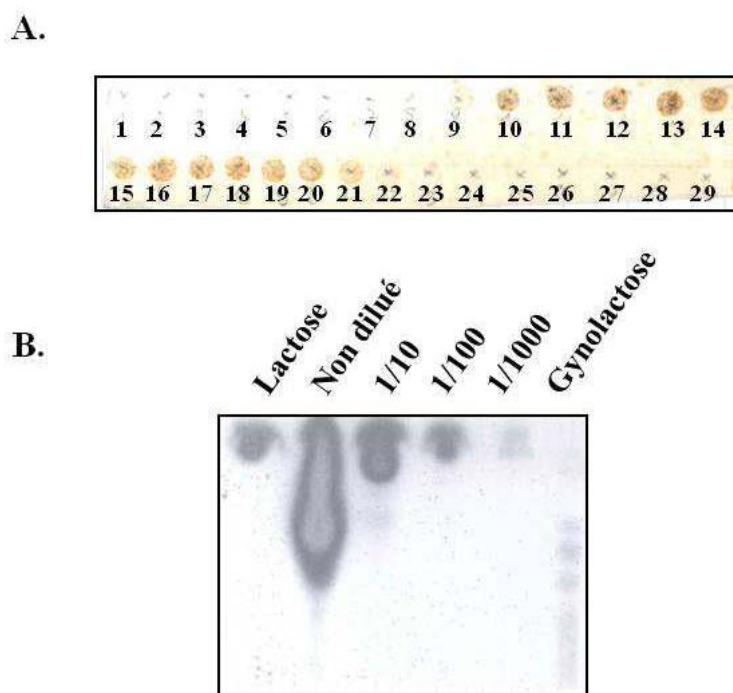


Figure 78 : Analyse des oligosaccharides libres du lait de brebis (Echantillon 40078). En A est représenté un blot sur plaque de silice des fractions collectées à la sortie de la colonne échangeuse d'anions. Les fractions oligosaccharidiques sont révélées à l'orcinol sulfurique. En B, chromatographie couche mince du « pool » des fractions oligosaccharidique récoltées en A. Les oligosaccharides ont été déposés sous forme non diluée ou diluée au 1/10, 1/100 ou 1/1000. Le lactose et le gynolactose sont utilisés comme témoins.

3.2. Séparation du lactose des autres oligosaccharides

Pour séparer le lactose des autres oligosaccharides de nos échantillons, nous avons utilisé une chromatographie gel filtration. En effet, la migration du lactose est retardée dans la colonne P4 (Matériel et méthodes 2.4.5.3.) que nous avons utilisée. Comme pour la colonne 50x2, nous avons recherché dans quelles fractions se trouvaient les oligosaccharides en déposant directement un échantillon de chaque fraction sur plaque de silice. Après révélation de la plaque à l'orcinol sulfurique, nous avons récupéré les fractions 23 à 62 pour l'échantillon 40078, 23 à 63 pour l'échantillon 40127, 22 à 68 pour l'échantillon 40218 et enfin 24 à 65 pour l'échantillon 40362. Chaque fraction a ensuite été soumise à une migration en chromatographie couche mince.

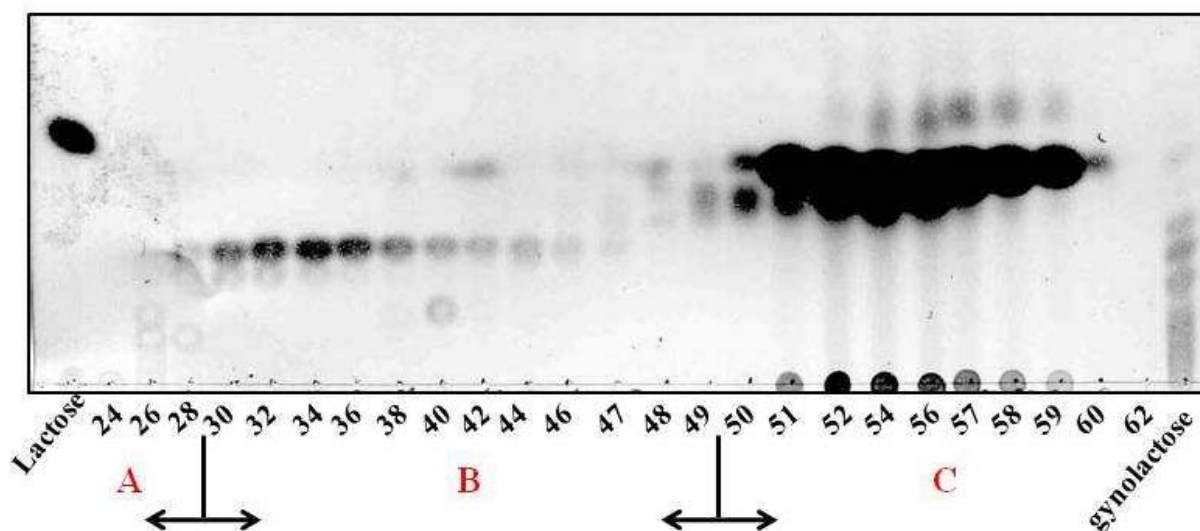


Figure 79 : Chromatographie sur couche mince des oligosaccharides du lait de brebis en sortie de colonne gel-filtration P4 (Echantillon 40078). Le lactose et le gynolactose sont utilisés comme témoins de migration. A, B et C représentent les différents types de fractions oligosaccharidiques éluées.

Le résultat de cette CCM montre très clairement que la chromatographie gel filtration a très bien fonctionné et qu'elle nous a permis d'identifier pour chaque échantillon de lait trois fractions différentes (Figure 79). La fraction A renferme des oligosaccharides de haut poids moléculaire, la fraction B les oligosaccharides qui nous intéresse plus particulièrement et la fraction C correspond au lactose (Figure 79). Le Tableau XII rend compte de la répartition des fractions A, B et C des quatre échantillons.

Tableau XII : Identification des fractions oligosaccharidiques A, B et C en sortie de chromatographie gel-filtration P4 dans les différents échantillons de lait de brebis.

Echantillon / Fraction	40078	40127	40218	40362
A	23 à 28	23	22 à 27	24 à 27
B	29 à 49	25 à 48	28 à 49	28 à 50
C	50 à 62	49 à 63	50 à 68	51 à 65

Par la suite, les tubes appartenant à une même fraction ont été regroupés en un seul et nous avons effectué une nouvelle migration de la fraction B par CCM. Cette chromatographie nous a permis de nous rendre compte que nous avons presque complètement éliminé toute trace de lactose. L'analyse structurale des autres oligosaccharides devient alors plus réalisable (Figure 80).

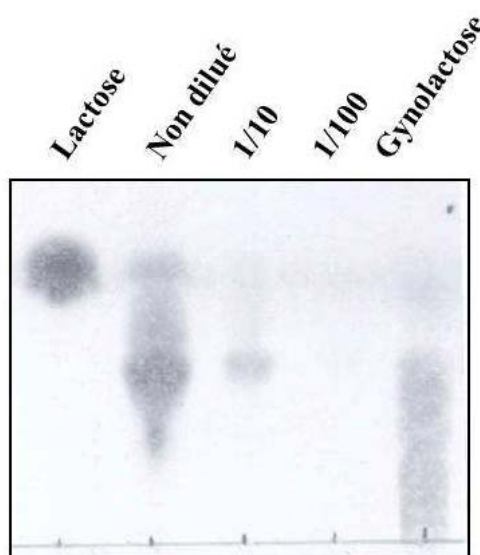


Figure 80 : Chromatographie couche mince de la fraction B de l'échantillon 40078 après regroupement des tubes 29 à 49. Les oligosaccharides ont été déposés non dilués ou dilués au 1/10 et au 1/100. Le lactose et le gynolactose servent de témoins de migration.

3.3. Séparation des fractions oligosaccharidiques neutres et acides

Dans le but de faciliter davantage la détermination des structures oligosaccharidiques présentes dans nos échantillons, nous avons décidé de séparer les oligosaccharides neutres des oligosaccharides acides (dont les oligosaccharides sialylés). Pour ce faire nous avons utilisé la chromatographie d'échange de cations (Dowex 1x2 ; Matériel et méthodes 2.4.5.4.). Après injection de la fraction B de chaque échantillon, l'élution s'est déroulée en deux temps. La première a été réalisée avec de l'eau et a permis de récolter les oligosaccharides neutres. Après identification de l'ensemble des fractions contenant les oligosaccharides neutres (Tableau XIII), une seconde élution a été réalisée avec de l'acétate de pyridine afin de décrocher les oligosaccharides acides. Les fractions contenant ces oligosaccharides ont ensuite été identifiées et regroupées en une seule (Tableau XIII).

Tableau XIII : Identification des fractions oligosaccharidiques neutres et acides en sortie de chromatographie d'échange de cations.

Echantillon	40078	40127	40218	40362
1 ^{ère} élution	4 à 6	9 à 17	4 à 8	5 à 9
2 ^{nde} élution	5 à 12	6 à 12	7 à 15	8 à 15

Nous avons ensuite comparé par CCM les profils des oligosaccharides neutres et acides de chaque échantillon. Que ce soit pour les échantillons à faible taux leucocytaire ou ceux présentant un taux élevé de cellules sanguines, les profils sont similaires (Figure 81). Il semble dans un premier temps qu'il n'y ait pas de réelle différence quantitative entre les fractions neutres et acides. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les oligosaccharides neutres ont des masses moléculaires généralement plus faibles que celles des oligosaccharides acides. Cependant, nous pouvons tout de même observer l'existence de structures neutres au niveau des hautes masses moléculaires (Figure 81).

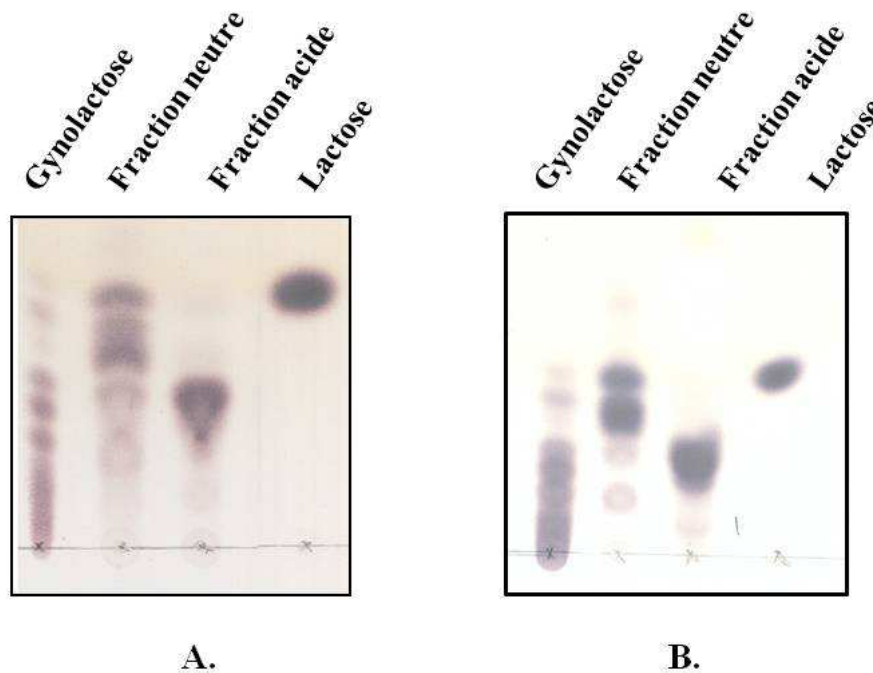


Figure 81 : Chromatographie couche mince des fractions oligosaccharidiques neutres et acides du lait de brebis. *En A, échantillon à faible taux leucocytaire 40078 et en B, échantillon 40218 à fort taux leucocytaire. Les témoins de migration que nous avons utilisés sont le gynolactose et le lactose.*

Enfin, nous avons réalisé une analyse comparative des profils oligosaccharidiques du lait des populations à faible et forte teneur en cellules leucocytaires (Figure 82). Au niveau des fractions oligosaccharidiques acides, nos résultats ne montrent pas de différence significative apparente entre les deux populations (Figure 82B). Par contre, il semble qu'il y ait quelques petites différences pour les oligosaccharides neutres. En effet, l'échantillon à faible taux leucocytaire 40078 présente une bande majoritaire qui migre au niveau de la première bande du gynolactose, cette bande étant absente dans l'échantillon 40218 à fort taux leucocytaire (Figure 82A). En revanche, les deux bandes de forte intensité identifiées dans l'échantillon 40218 et qui migrent aux alentours du lactose ne sont quasiment pas retrouvées dans l'échantillon 40078. Ne pouvant pas tirer de conclusions solides à partir de cette analyse, nous avons donc décidé de poursuivre notre étude par une analyse structurale en spectrométrie de masse des différentes fractions oligosaccharidiques.

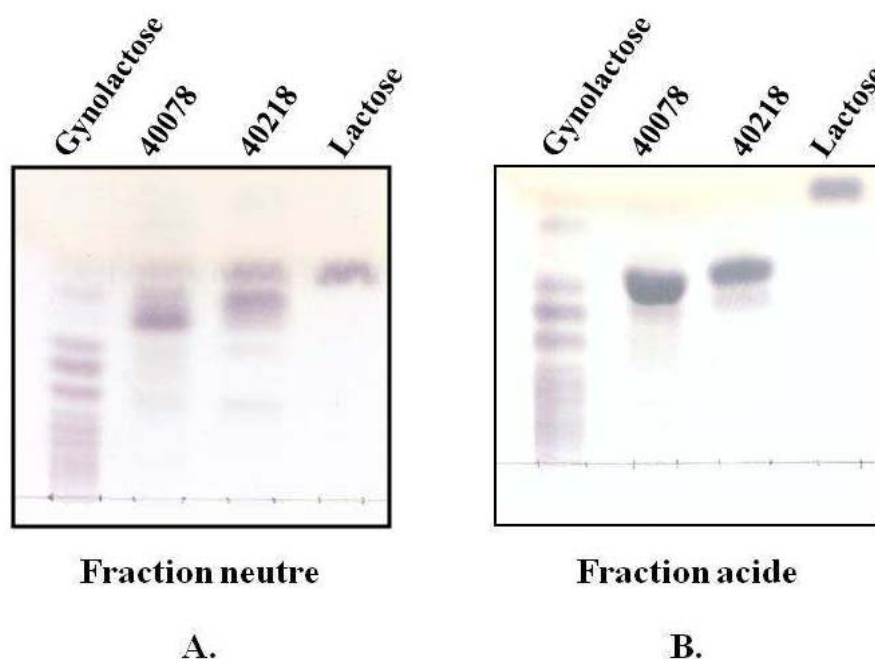


Figure 82 : Analyse comparative en chromatographie couche mince des fractions oligosaccharidiques du lait de brebis entre une population présentant un taux élevé de leucocytes (40218) et une population présentant un taux faible de leucocytes (40078). La partie A de la figure correspond à la comparaison entre ces populations de la fraction oligosaccharidique neutre, la partie B à la fraction oligosaccharidique acide. Dans les deux cas, les témoins de migrations sont le lactose et le gynolactose.

3.4. Etude structurale des oligosaccharides libres du lait de brebis

Nous avons donc essayé de déterminer la structure des oligosaccharides libres du lait de brebis. Pour ce faire, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de la spectrométrie de masse. Deux méthodes ont été utilisées. La première a été une analyse directe des oligosaccharides par MALDI-TOF, la seconde une analyse MS-MS par ION TRAP des oligosaccharides perméthylés. L'avantage d'étudier les oligosaccharides perméthylés est qu'ils donnent des informations sur les liaisons glycosidiques.

L'ensemble des manipulations de spectrométrie de masse et de leurs interprétations a été réalisé par le Dr. Yann Guerardel. Les résultats que nous avons obtenus sont identiques entre les individus à faible et fort taux leucocytaire dans le lait. Ils nous ont permis d'identifier 14 oligosaccharides libres différents qui ont été répertoriés dans le Tableau XIV. Nous n'avons retrouvé que très peu d'oligosaccharides fucosylés, en effet seuls deux des quinze oligosaccharides du lait de brebis

contiennent un résidu de fucose et aucun d'entre eux n'est à la fois fucosylé et sialylé. Par contre, la moitié des oligosaccharides retrouvés sont sialylés, l'acide sialique majoritairement retrouvé étant le NeuGc, le Neu5Ac n'étant que très faiblement représenté. Il est tout de même intéressant de remarquer que la sialyl et la *N*-glycolyl-lactosamine sont bien présentes dans le répertoire des oligosaccharides mais la liaison de l'acide sialique n'a pas pu être précisée (Tableau XIV).

Tableau XIV : Structure des oligosaccharides libres du lait de brebis. *Les liaisons glycosidiques sont représentées en rouge, les ? indiquent que le groupement hydroxyle sur lequel se greffe le monosaccharide n'a pas pu être identifié. HexNAc indique la présence d'une N-acétylhexosamine dont la nature n'a pu être précisée.*

	Oligosaccharide	Formule
Neutres	Lactose	Gal β 1,4Glc
	Hexose-lactose	Hex β 1,?Gal β 1,4Glc
	Hexosamine-lactose	HexNAc β 1,?Gal β 1,4Glc
	Fucosyl-lactose	Gal β 1,4[Fuc α 1,?]Glc
	Hexosamine-Fucosyl-lactose	HexNAc β 1,?Gal β 1,4[Fuc α 1,?]Glc
	Lacto-N-tétraose (In4)	Gal β 1,3/4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
	Lacto-N-Hexaose (In6)	Gal β 1,?GlcNAc β 1,3Gal β 1,?GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
Acides	<i>N</i> -glycolyl-lactose	NeuGc α 2,?Gal β 1,4Glc
	Sialyl-Lactose	NeuAc α 2,?Gal β 1,4Glc
	<i>N</i> -glycolyl-lactosamine	NeuGc α 2,?Gal β 1,4GlcNAc
	Sialyl-lactosamine	NeuAc α 2,?Gal β 1,4GlcNAc
	<i>N</i> -glycolyl-lacto-N-tétraose	NeuGc α 2,?Gal β 1,3/4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
	<i>N</i> -glycolyl-lacto-N-Hexaose	NeuGc α 2,?Gal β 1,?GlcNAc β 1,3Gal β 1,?GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
	Di <i>N</i> -glycolyl galacto lactose	(NeuGc) $_2\alpha$ 2,?Gal β 1,?Gal β 1,4Glc

3.5. Conclusion

Les travaux que nous venons de présenter sur les oligosaccharides libres du lait de brebis sont préliminaires. Nous avons pu identifier 14 types d'oligosaccharides mais pour beaucoup la structure est encore incomplète. Ainsi, l'identification de la nature de certaines N-acétylhexosamines et la détermination de l'ensemble des liaisons glycosidiques pourraient enrichir considérablement le nombre d'oligosaccharides. Cependant, la diversité en oligosaccharides libres du lait de brebis restera largement inférieure à celle retrouvée chez la femme qui compte plus de 200 sortes d'oligosaccharides.

A la vue de nos résultats, nous n'avons pas observé de différence dans la composition oligosaccharidiques des laits de population à faible et fort taux de cellules sanguines qui permettent d'expliquer la différence de sensibilité à l'infection. Cependant, comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe 1.6.5., ce serait le type de liaison de l'acide sialique à l'oligosaccharide qui serait impliqué dans le mécanisme de défense. Or, nous n'avons pu déterminer pour aucun des oligosaccharides acides la nature de la liaison des acides sialiques. Il serait donc particulièrement intéressant de poursuivre cette étude.

Ainsi, seule la détermination de façon claire et définitive de la structure des oligosaccharides présents dans le lait de l'une et l'autre des populations de brebis pourrait nous dire si la composition globale en oligosaccharide a une influence sur la susceptibilité des animaux à développer des pathologies. Pour ce faire, il faut envisager une étude structurale plus approfondie. Par exemple, il faudrait réussir à purifier un par un les oligosaccharides et mener une étude structurale par RMN. A l'heure actuelle, nous avons envisagé de coupler les oligosaccharides à un chromophore, la 2-aminopyridine, dans le but de faciliter leur purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Ces travaux sont pour le moment au niveau des essais et devront être poursuivis.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De part leur position aux extrémités des chaînes glycaniques, les acides sialiques et les fucoses participent pour beaucoup aux propriétés des glycanes. Ils constituent des antigènes qui sont impliqués dans de nombreuses interactions ligand-récepteur ou cellule-cellule qui s'avèrent être essentielles pour assurer des fonctions physiologiques telles que l'embryogénèse, la migration cellulaire ou encore la cohésion tissulaire. Ces antigènes jouent également un rôle important lors des réponses inflammatoire et immunitaire et sont malheureusement de par leur localisation les récepteurs d'un grand nombre de pathogènes. Le travail qui a été réalisé au cours de cette thèse avait pour but d'enrichir les connaissances sur les enzymes bovines impliquées dans les étapes finales de la glycosylation. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à deux gènes, un gène de sialyltransférase, *ST6Gal II* et un gène de fucosyltransférase, *fut7*.

Les structures Sia₆LacNAc sont impliquées dans un grand nombre de réactions physiopathologiques telles que la clairance des glycoprotéines sériques, le développement tissulaire, l'activation et la prolifération des lymphocytes B. Ce sont également des structures qui participent à la réponse inflammatoire et qui apparaissent comme facteurs de mauvais pronostic durant certains cancers. L'implication de ces structures dans une telle diversité de fonctions toutes aussi importantes les unes que les autres démontrent l'intérêt d'étudier les enzymes qui aboutissent à leur formation. La sialylation, qui constitue l'étape finale de la biosynthèse de cet épitope glucidique, est assurée par la famille des β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases. ST6Gal II, la seconde enzyme appartenant à cette famille, n'a été découverte que depuis quelques années chez l'homme (Takashima *et al.*, 2002 ; Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003) et très peu de choses sont connues sur ses rôles biologiques. Cependant, son profil d'expression tissulaire restreint et ses spécificités de substrat différentes de celles de ST6Gal I laissent présager d'une fonction particulière restant à identifier. Ainsi, nous avons tenté d'apporter au cours de cette thèse quelques éléments de réponse à cette question en étudiant ce gène et son produit chez le bovin durant la réponse inflammatoire.

Le gène n'étant pas identifié chez *Bos taurus*, notre stratégie de clonage s'est basée sur les similitudes existant entre les séquences d'un même gène entre différentes espèces. Cette approche a permis l'identification de *bST6Gal II* dont la structure s'est révélée présenter une organisation de la région codante similaire à celle des gènes humain et murin. En effet, nous avons décrit une structure en 5 exons codants dont le découpage, à l'exception du premier exon, est particulièrement bien conservé entre le bovin, l'homme et la souris.

La protéine qu'il code adopte la conformation d'une protéine transmembranaire de type 2, structure communément retrouvée chez les sialyltransférases. Elle se compose d'un court domaine N-terminal cytosolique, d'un unique domaine transmembranaire qui se prolonge dans la lumière de l'appareil de Golgi par une région tige et un domaine C-terminal catalytique. Elle se différencie de ses homologues par sa petite taille, 495 aa contre respectivement 529 et 524 aa pour l'homme et la souris, cette différence étant principalement due à la longueur de la région tige. Malgré cela, l'enzyme présente un taux d'identité de séquence supérieur à 65% avec ses homologues et l'ensemble des sialylmotifs et des motifs spécifiques des β -galactoside- α 2,6-sialyltransférases ont été identifiés. Au niveau catalytique, bST6Gal II a des spécificités de substrats très similaires à celles de hST6Gal II et mST6Gal II. En effet, la sialyltransférase bovine a également une affinité plus prononcée pour les oligosaccharides libres que pour les glycoprotéines et préfère comme substrat accepteur le LacdiNAc au LacNAc. Nous nous sommes aussi rendu compte que la région tige n'est pas nécessaire au mécanisme catalytique de bST6Gal II comme en témoignent nos tests d'activité, les formes membranaires et solubles de l'enzyme présentant des constantes d'affinité très proches les unes des autres. Enfin, la parfaite conservation des deux sites de *N*-glycosylation bordant le sialylmotif I chez l'homme, la souris et le bovin soulève la question du taux d'occupation et surtout de l'impact que pourrait avoir ces glycanes sur la sialyltransférase. Pour répondre à cette question, nous sommes en train de construire par mutagenèse dirigée divers mutants et les premiers résultats tendent à prouver que l'occupation du premier site est primordiale pour permettre à l'enzyme de transférer l'acide sialique.

Le gène *bST6Gal II* présente un profil d'expression assez restreint comparé *bST6Gal I* qui a une expression ubiquitaire. Pour autant, ce profil nous est apparu moins strict que celui de ses homologues humain et murin. Il est principalement exprimé dans le poumon, le cerveau, la rate et le colon mais est également détecté dans les glandes salivaires et mammaires. Trois transcrits (a_1 , a_2 et b) ont pu être mis en évidence et leur transcription est sous la dépendance de deux promoteurs distincts, P_A et P_B , dont la présence des sites de fixation de facteurs de transcription tels que SP1, NF1, CREB et SMAD ne peut expliquer pleinement l'expression spécifique des transcrits a_1 et b dans le cerveau ou celle du transcrit a_2 dans tous les tissus exprimant le gène. Cependant, le promoteur P_A possède une séquence de fixation pour le facteur AP-1 (complexe c-jun/c-fosI) dont l'apparition peut être directement corrélée à l'activation de la voie de l'IL-6. Cette donnée est en adéquation avec nos résultats expérimentaux qui montrent que *bST6Gal II* est surexprimé durant

l'induction de la réponse inflammatoire par l'IL-6 dans des cellules épithéliales de glande mammaire.

Bien que nous ayons pu démontrer que *bST6Gal II* est impliqué dans le processus de réponse inflammatoire, il nous reste à déterminer quelles sont les cibles qui sont affectées par la sialyltransférase dans ces conditions et surtout la manière dont elles participent à la défense de l'organisme. Cette identification passera inévitablement par la mise au point d'une analyse protéomique poussée.

L'autre partie de cette thèse avait pour but d'identifier la fucosyltransférase bovine responsable de la biosynthèse de l'antigène tissulaire SLe^x, celui-ci jouant un rôle essentiel dans le recrutement leucocytaire au site inflammatoire. Le gène *FUT7* qui code cette enzyme a été identifié chez l'homme par Sasaki *et al.* en 1994 et par Smith *et al.* en 1996 chez la souris. Ainsi, tout comme nous l'avons fait pour *ST6Gal II*, le clonage du gène *fut7b* a été entrepris en se servant des homologues de séquence existant entre gènes homologues d'espèces différentes. Le cadre de lecture du gène bovin s'est révélé présenter un taux d'identité particulièrement élevé vis-à-vis des gènes humain et murin, cette ressemblance de l'ordre de 80% est un témoin fort de la conservation inter-espèces de ce gène au cours de l'évolution. La ressemblance s'est également retrouvée au niveau de l'organisation génique, du profil d'expression tissulaire, de la structure de la protéine mais aussi des caractéristiques enzymatiques. En effet, le gène bovin adopte strictement la même configuration que le gène humain à savoir une organisation de la région codante en deux exons mais surtout une stricte conservation de la jonction exon/intron. De même, nous avons mis en évidence un profil d'expression tissulaire très similaire, les gènes humain et bovin étant tout les deux très peu répandus et principalement exprimés dans les organes lymphoïdes. Le bovin présente cependant une expression tissulaire un peu plus étendue puisqu'il a été détecté dans le foie et le poumon. Au niveau protéique, nous avons observé une conservation presque parfaite des motifs spécifiques des α 3-fucosyltransférases entre les enzymes bovine, humaine et murine qui se traduit au niveau enzymatique par des spécificités de substrats accepteurs identiques.

L'ensemble de ces données ajouté au fait que ce gène est très peu polymorphe tendent à prouver que les fonctions réalisées par cette enzyme sont essentielles. D'ailleurs, le KO de *fut7* chez la souris (Maly *et al.*, 1996) ou la présence d'une mutation inactivante à l'état homozygote chez l'homme (Bengtson *et al.*, 2001) conduit à l'apparition de pathologies et de désordres de la réponse immunitaire. Chez *Bos taurus*, notre étude de polymorphisme a donné des résultats plus surprenants car il semble que le gène présente un taux de polymorphisme plus élevé. Parmi les SNP que nous

avons détectés, la plupart sont des mutations silencieuses mais l'une d'entre elle, la substitution G335A, suscite notre intérêt. En effet, située juste en amont du motif-III des α 3-fucosyltransférases et conduisant tout comme la mutation G329A humaine au remplacement d'une arginine en glutamine, il sera très intéressant d'étudier ses conséquences tant au niveau moléculaire qu'au niveau physiologique.

Le but initial de ce projet consistait à déterminer si la variabilité entre individus du taux de cellules leucocytaires présentes dans les laits pouvait être corrélée à la présence de différents allèles de *fut7*. Certains des SNP de la région codante que nous avons identifiés peuvent potentiellement modifier les propriétés enzymatiques de *fut7* mais sont ils suffisants pour expliquer de grands écarts du taux de cellules sanguines dans le lait ? Pour compléter ce travail, il faudra réaliser une étude de la région promotrice de *fut7b*. Elle comprendra une analyse des sites de fixation des facteurs de transcription et une recherche de polymorphisme qui pourront se concrétiser par une analyse fonctionnelle. Il est en effet envisageable qu'une mutation de la région promotrice puisse favoriser une transcription accrue voire constitutive de *fut7b* et de ce fait entraîner une augmentation de la synthèse de l'antigène SLe^x dont la présence favoriserait le passage des leucocytes dans le lait.

Ce travail de thèse a permis d'enrichir quelque peu les connaissances des sialyl- et fucosyltransférases bovines. Nous avons pu apporter des débuts de réponse quant à la fonction biologique jouée par ST6Gal II mais qui ont bien évidemment apportés de nouvelles questions. De même, l'étude du gène *fut7b* ne nous a pas donné les réponses que nous cherchions mais nous a conduits vers de nouveaux modèles d'étude. Ainsi, à l'issue de ce travail de thèse, beaucoup de questions restent en suspens et je souhaite que l'UMR 1061 de « Génétique Moléculaire Animale » puisse continuer ce travail passionnant. Quant à moi, cette expérience m'a permis de conforter mon désir de continuer dans ce domaine d'activité, ma curiosité et mon envie de comprendre étant plus que jamais développées.

BIBLIOGRAPHIE

- Aas-Eng, D. A., Asheim, H. C., Deggerdal, A., Smeland, E. and Funderud, S. (1995). Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 166-9.
- Abeijon, C. and Hirschberg, C. B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **17**, 32-6.
- Adams, J. C. and Tucker, R. P. (2000). The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* **218**, 280-99.
- Aebi, M. and Hennet, T. (2001). Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* **11**, 136-41.
- Akimoto, Y., Kreppel, L. K., Hirano, H. and Hart, G. W. (1999). Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes* **48**, 2407-13.
- Allahverdian, S., Wojcik, K. R. and Dorscheid, D. R. (2006). Airway epithelial wound repair: role of carbohydrate sialyl Lewisx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L828-36.
- Anderson, D. C. and Springer, T. A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med* **38**, 175-94.
- Angata, K., Suzuki, M. and Fukuda, M. (2002). ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem* **277**, 36808-17.
- Angata, K., Suzuki, M., McAuliffe, J., Ding, Y., Hindsgaul, O. and Fukuda, M. (2000). Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J Biol Chem* **275**, 18594-601.
- Angata, K., Yen, T. Y., El-Battari, A., Macher, B. A. and Fukuda, M. (2001). Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity. *J Biol Chem* **276**, 15369-77.
- Angata, T. and Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**, 439-69.
- Apoil, P. A., Roubinet, F., Despiau, S., Mollicone, R., Oriol, R. and Blancher, A. (2000). Evolution of alpha 2-fucosyltransferase genes in primates: relation between an intronic Alu-Y element and red cell expression of ABH antigens. *Mol Biol Evol* **17**, 337-51.
- Appelmek, B. J., Negrini, R., Moran, A. P. and Kuipers, E. J. (1997). Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol* **5**, 70-3.
- Appenheimer, M. M., Huang, R. Y., Chandrasekaran, E. V., Dalziel, M., Hu, Y. P., Soloway, P. D., Wuensch, S. A., Matta, K. L. and Lau, J. T. (2003). Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. *Glycobiology* **13**, 591-600.
- Ashwell, G. and Morell, A. (1974a). The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *Biochem Soc Symp*, 117-24.
- Ashwell, G. and Morell, A. G. (1974b). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **41**, 99-128.
- Avent, N. D., Martin, P. G., Armstrong-Fisher, S. S., Liu, W., Finning, K. M., Maddocks, D. and Urbaniak, S. J. (1997). Evidence of genetic diversity underlying Rh D-, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood* **89**, 2568-77.
- Baboval, T., Koul, O. and Smith, F. I. (2000). N-glycosylation site occupancy of rat alpha-1,3-fucosyltransferase IV and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* **1475**, 383-9.
- Barraud, J. P., Saunier, K., Souchare, J., Delourme, D., Oulmouden, A., Oriol, R., Leveziel, H., Julien, R. and Petit, J. M. (2000). Three bovine alpha2-fucosyltransferase genes encode enzymes that preferentially transfer fucose on Galbeta1-3GalNAc acceptor substrates. *Glycobiology* **10**, 611-21.
- Barret, A., Forestier, L., Deslys, J. P., Julien, R. and Gallet, P. F. (2005). Glycosylation-related gene expression in prion diseases: PrPSc accumulation in scrapie infected GT1 cells depends on beta-1,4-linked GalNAc-4-SO4 hyposulfation. *J Biol Chem* **280**, 10516-23.
- Becker, D. J. and Lowe, J. B. (2003). Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**, 41R-53R.
- Bengtson, P., Larson, C., Lundblad, A., Larson, G. and Pahlsson, P. (2001). Identification of a missense mutation (G329A;Arg(110)--> GLN) in the human FUT7 gene. *J Biol Chem* **276**, 31575-82.
- Bengtson, P., Lundblad, A., Larson, G. and Pahlsson, P. (2002). Polymorphonuclear leukocytes from individuals carrying the G329A mutation in the alpha 1,3-fucosyltransferase VII gene (FUT7) roll on E- and P-selectins. *J Immunol* **169**, 3940-6.
- Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J. and Butcher, E. C. (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* **174**, 1461-6.
- Blix, F. G., Gottschalk, A. and Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* **179**, 1088.
- Bose, S., Mucke, M. and Freedman, R. B. (1994). The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans-isomerase from the endoplasmic-reticulum lumen. *Biochem J* **300** (Pt 3), 871-5.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brinkman-Van der Linden, E. C., Sjöberg, E. R., Juneja, L. R., Crocker, P. R., Varki, N. and Varki, A. (2000). Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. *J Biol Chem* **275**, 8633-40.

- Brinkman-Van der Linden, E. C. and Varki, A.** (2000). New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* 275, 8625-32.
- Brito, C., Escrevente, C., Reis, C. A., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. and Costa, J.** (2007). Increased levels of fucosyltransferase IX and carbohydrate Lewis(x) adhesion determinant in human NT2N neurons. *J Neurosci Res* 85, 1260-70.
- Brockhausen, I.** (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1473, 67-95.
- Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C. and Taylor-Papadimitriou, J.** (1995). Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 233, 607-17.
- Bunting, M., Harris, E. S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. and Zimmerman, G. A.** (2002). Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 9, 30-5.
- Cacan, R. and Verbert, A.** (1999). Free and N-linked oligomannosides as markers of the quality control of newly synthesized glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 1-5.
- Cailleau-Thomas, A., Coullin, P., Candelier, J. J., Balanzino, L., Mennesson, B., Oriol, R. and Mollicone, R.** (2000). FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis. *Glycobiology* 10, 789-802.
- Cameron, H. S., Szczepaniak, D. and Weston, B. W.** (1995). Expression of human chromosome 19p alpha(1,3)-fucosyltransferase genes in normal tissues. Alternative splicing, polyadenylation, and isoforms. *J Biol Chem* 270, 20112-22.
- Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A. M. and Calatroni, A.** (2006). Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. *Mini Rev Med Chem* 6, 1311-20.
- Cao, Y., Mahrenholz, A. M., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J.** (1993). Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J Biol Chem* 268, 14687-93.
- Carraway, K. L. and Hull, S. R.** (1991). Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* 1, 131-8.
- Chantret, I., Dancourt, J., Dupre, T., Delenda, C., Bucher, S., Vuillaumier-Barrot, S., Ogier de Baulny, H., Peletan, C., Danos, O., Seta, N. et al.** (2003). A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl alpha3-glycosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *J Biol Chem* 278, 9962-71.
- Chapman, B. S., Eckart, M. R., Kaufman, S. E. and Lapointe, G. R.** (1996). O-linked oligosaccharide on the 75-kDa neurotrophin receptor. *J Neurochem* 66, 1707-16.
- Chen, C. and Colley, K. J.** (2000). Minimal structural and glycosylation requirements for ST6Gal I activity and trafficking. *Glycobiology* 10, 531-83.
- Chen, G. Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L. F. and Kannagi, R.** (2006). Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16894-9.
- Chen, J., Moloney, D. J. and Stanley, P.** (2001). Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13716-21.
- Chen, Y. J., Wing, D. R., Guile, G. R., Dwek, R. A., Harvey, D. J. and Zamze, S.** (1998). Neutral N-glycans in adult rat brain tissue--complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *Eur J Biochem* 251, 691-703.
- Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A. and Endo, T.** (1997). Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 272, 2156-62.
- Chou, H. H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K. L., Muchmore, E. A., Nelson, D. L., Warren, S. T. and Varki, A.** (1998). A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11751-6.
- Collins, B. E., Blixt, O., Bovin, N. V., Danzer, C. P., Chui, D., Marth, J. D., Nitschke, L. and Paulson, J. C.** (2002). Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knockout mice: novel sialoside probe for murine CD22. *Glycobiology* 12, 563-71.
- Collins, B. E., Blixt, O., DeSieno, A. R., Bovin, N., Marth, J. D. and Paulson, J. C.** (2004). Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6104-9.
- Comer, F. I. and Hart, G. W.** (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40, 7845-52.
- Cooper, H. S., Malecha, M. J., Bass, C., Fagel, P. L. and Steplewski, Z.** (1991). Expression of blood group antigens H-2, Le(y), and sialylated-Le(a) in human colorectal carcinoma. An immunohistochemical study using double-labeling techniques. *Am J Pathol* 138, 103-10.
- Costache, M., Apoil, P. A., Cailleau, A., Elmgren, A., Larson, G., Henry, S., Blancher, A., Iordachescu, D., Oriol, R. and Mollicone, R.** (1997). Evolution of fucosyltransferase genes in vertebrates. *J Biol Chem* 272, 29721-8.
- Coullin, P., Crooijmans, R. P., Fillon, V., Mollicone, R., Groenen, M. A., Adrien-Dehais, C., Bernheim, A., Zoorob, R., Oriol, R. and Candelier, J. J.** (2003). Cytogenetics, conserved synteny and evolution of chicken fucosyltransferase genes compared to human. *Cytogenet Genome Res* 103, 111-21.
- Coullin, P., Crooijmans, R. P., Groenen, M. A., Heilig, R., Mollicone, R., Oriol, R. and Candelier, J. J.** (2002). Assignment of FUT8 to chicken chromosome band 5q1.4 and to human chromosome 14q23.2-->q24.1 by in situ hybridization. Conserved and compared synteny between human and chicken. *Cytogenet Genome Res* 97, 234-8.
- Crocker, P. R. and Varki, A.** (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology* 103, 137-45.
- Crouse, G. F., Frischauf, A. and Lehrach, H.** (1983). An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods Enzymol* 101, 78-89.

- Dall'Olio, F. (2000). The sialyl-alpha2,6-lactosaminy-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconj J* 17, 669-76.
- Dall'Olio, F., Chiricolo, M., D'Errico, A., Gruppioni, E., Altamari, A., Fiorentino, M. and Grigioni, W. F. (2004). Expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase and of alpha2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology* 14, 39-49.
- Dall'Olio, F., Malagolini, N. and Serafini-Cessi, F. (1992). The expression of soluble and cell-bound alpha 2,6 sialyltransferase in human colonic carcinoma CaCo-2 cells correlates with the degree of enterocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 1405-10.
- Dalziel, M., Huang, R. Y., Dall'Olio, F., Morris, J. R., Taylor-Papadimitriou, J. and Lau, J. T. (2001). Mouse ST6Gal sialyltransferase gene expression during mammary gland lactation. *Glycobiology* 11, 407-12.
- Dalziel, M., Lemaire, S., Ewing, J., Kobayashi, L. and Lau, J. T. (1999). Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. *Glycobiology* 9, 1003-8.
- Datta, A. K., Chammas, R. and Paulson, J. C. (2001). Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J Biol Chem* 276, 15200-7.
- Datta, A. K. and Paulson, J. C. (1995). The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J Biol Chem* 270, 1497-500.
- Datta, A. K., Sinha, A. and Paulson, J. C. (1998). Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J Biol Chem* 273, 9608-14.
- De Praeter, C. M., Gerwig, G. J., Bause, E., Nuytinck, L. K., Vlieghehart, J. F., Breuer, W., Kamerling, J. P., Espeel, M. F., Martin, J. J., De Paepe, A. M. et al. (2000). A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet* 66, 1744-56.
- De Vries, T., Knegt, R. M., Holmes, E. H. and Macher, B. A. (2001). Fucosyltransferases: structure/function studies. *Glycobiology* 11, 119R-128R.
- Dekker, J., Rossen, J. W., Buller, H. A. and Einerhand, A. W. (2002). The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 27, 126-31.
- Dennis, J. W., Granovsky, M. and Warren, C. E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* 21, 412-21.
- Dias, W. B. and Hart, G. W. (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* 3, 766-72.
- Domino, S. E., Zhang, L., Gillespie, P. J., Saunders, T. L. and Lowe, J. B. (2001). Deficiency of reproductive tract alpha(1,2)fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha(1,2)fucosyltransferase locus. *Mol Cell Biol* 21, 8336-45.
- Dong, D. L. and Hart, G. W. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* 269, 19321-30.
- Drickamer, K. (1993). A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* 3, 2-3.
- Dupuy, F., Germot, A., Julien, R. and Maftah, A. (2004). Structure/function study of Lewis alpha3- and alpha3/4-fucosyltransferases: the alpha1,4 fucosylation requires an aromatic residue in the acceptor-binding domain. *Glycobiology* 14, 347-56.
- Easton, E. W., Schiphorst, W. E., van Drunen, E., van der Schoot, C. E. and van den Eijnden, D. H. (1993). Human myeloid alpha 3-fucosyltransferase is involved in the expression of the sialyl-Lewis(x) determinant, a ligand for E- and P-selectin. *Blood* 81, 2978-86.
- Eckhardt, A. E. and Goldstein, I. J. (1983). Isolation and characterization of a family of alpha-D-galactosyl-containing glycopeptides from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry* 22, 5290-7.
- Edwards, N. J., Monteiro, M. A., Faller, G., Walsh, E. J., Moran, A. P., Roberts, I. S. and High, N. J. (2000). Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol Microbiol* 35, 1530-9.
- Ellies, L. G., Sperandio, M., Underhill, G. H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J. J., Kansas, G. S., Ley, K. and Marth, J. D. (2002). Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* 100, 3618-25.
- Endo, T. (2004). Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J* 21, 3-7.
- Engel, P., Nojima, Y., Rothstein, D., Zhou, L. J., Wilson, G. L., Kehrl, J. H. and Tedder, T. F. (1993). The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J Immunol* 150, 4719-32.
- Fenteany, F. H. and Colley, K. J. (2005). Multiple signals are required for alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) oligomerization and Golgi localization. *J Biol Chem* 280, 5423-9.
- Finne, J., Krusius, T., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1979). Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem* 254, 10295-300.
- Fischer, H. D., Gonzalez-Noriega, A., Sly, W. S. and Morre, D. J. (1980). Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. Subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 255, 9608-15.
- Fondeur-Gelinotte, M., Lattard, V., Oriol, R., Mollicone, R., Jacquinet, J. C., Mulliert, G., Gulberti, S., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. et al. (2006). Phylogenetic and mutational analyses reveal key residues for UDP-glucuronic acid binding and activity of beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I). *Protein Sci* 15, 1667-78.
- Gagneux, P., Cheriyan, M., Hurtado-Ziola, N., van der Linden, E. C., Anderson, D., McClure, H., Varki, A. and Varki, N. M. (2003). Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J Biol Chem* 278, 48245-50.
- Gagneux, P. and Varki, A. (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9, 747-55.
- Gagneux, P. and Varki, A. (2001). Genetic differences between humans and great apes. *Mol Phylogenet Evol* 18, 2-13.
- Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3, 433-42.

- Geisow, M. J. (1991). Peptide synthesis--theme and variations. *Trends Biotechnol* 9, 294-5.
- Geremia, R. A., Harduin-Lepers, A. and Delannoy, P. (1997). Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology* 7, v-vii.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S. (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* 83, 257-62.
- Gonzalez de Peredo, A., Klein, D., Macek, B., Hess, D., Peter-Katalinic, J. and Hofsteenge, J. (2002). C-mannosylation and o-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Mol Cell Proteomics* 1, 11-8.
- Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M. A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J. J., Van Seuning, I. and Delannoy, P. (2008). IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem J* 410, 213-23.
- Grubenmann, C. E., Frank, C. G., Hulsmeier, A. J., Schollen, E., Matthijs, G., Mayatepek, E., Berger, E. G., Aebi, M. and Hennet, T. (2004). Deficiency of the first mannosylation step in the N-glycosylation pathway causes congenital disorder of glycosylation type Ik. *Hum Mol Genet* 13, 535-42.
- Guérardel, Y., Chang, L. Y., Maes, E., Huang, C. J. and Khoo, K. H. (2006). Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern. *Glycobiology* 16, 244-57.
- Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J. C. and Lefebvre, T. (2005). O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 37, 765-74.
- Guo, H. B., Lee, I., Bryan, B. T. and Pierce, M. (2005). Deletion of mouse embryo fibroblast N-acetylglucosaminyltransferase V stimulates alpha5beta1 integrin expression mediated by the protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* 280, 8332-42.
- Hallgren, P., Lundblad, A. and Svensson, S. (1975). A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine. *J Biol Chem* 250, 5312-4.
- Hamamoto, T., Kawasaki, M., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Lee, Y. C. and Tsuji, S. (1993). Two step single primer mediated polymerase chain reaction. Application to cloning of putative mouse, beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase cDNA. *Bioorg Med Chem* 1, 141-5.
- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 476-82.
- Hanasaki, K., Varki, A. and Powell, L. D. (1995). CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins. *J Biol Chem* 270, 7533-42.
- Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I. and Bevilacqua, M. P. (1994). Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem* 269, 10637-43.
- Hanisch, F. G., Schwientek, T., Von Bergwelt-Baildon, M. S., Schultze, J. L. and Finn, O. (2003). O-Linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 3242-54.
- Hao, L., Noguchi, S., Kamada, Y., Sasaki, A., Matsuda, M., Shimizu, K., Hiramatsu, Y. and Nakatsuka, M. (2008). Adverse effects of advanced glycation end products on embryonal development. *Acta Med Okayama* 62, 93-9.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S. and Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83, 727-37.
- Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P. and Oriol, R. (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 15, 805-17.
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J. M. and Oriol, R. (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol Biol* 8, 258.
- Harris, R. J. and Spellman, M. W. (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* 3, 219-24.
- Hase, S., Kawabata, S., Nishimura, H., Takeya, H., Sueyoshi, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., Shimonishi, Y. and Ikenaka, T. (1988). A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in bovine blood coagulation factors VII and IX. *J Biochem* 104, 867-8.
- Hauri, H. P., Nufer, O., Breuza, L., Tekaya, H. B. and Liang, L. (2002). Lectins and protein traffic early in the secretory pathway. *Biochem Soc Symp*, 73-82.
- Hedlund, M., Ng, E., Varki, A. and Varki, N. M. (2008). alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res* 68, 388-94.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-49.
- Helenius, J., Ng, D. T., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A. and Aebi, M. (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415, 447-50.
- Hennet, T., Chui, D., Paulson, J. C. and Marth, J. D. (1998). Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4504-9.
- Henry, S., Oriol, R. and Samuelsson, B. (1995). Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* 69, 166-82.
- Higa, H. H. and Paulson, J. C. (1985). Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids. *J Biol Chem* 260, 8838-49.

- Hinderlich, S., Stasche, R., Zeitler, R. and Reutter, W.** (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272, 24313-8.
- Hirota, K., Kanitani, H., Nemoto, K., Ono, T. and Miyake, Y.** (1995). Cross-reactivity between human sialyl Lewis(x) oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12, 159-64.
- Hirschberg, C. B.** (2001). Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II. *J Clin Invest* 108, 3-6.
- Hofsteenge, J., Huwiler, K. G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D. F. and Peter-Katalinic, J.** (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* 276, 6485-98.
- Holgersson, J. and Lofling, J.** (2006). Glycosyltransferases involved in type 1 chain and Lewis antigen biosynthesis exhibit glycan and core chain specificity. *Glycobiology* 16, 584-93.
- Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J.** (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4, 45-60.
- Hooper, L. V. and Gordon, J. I.** (2001). Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* 11, 1R-10R.
- Hounsell, E. F., Davies, M. J. and Renouf, D. V.** (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj J* 13, 19-26.
- Hounsell, E. F., Fukuda, M., Powell, M. E., Feizi, T. and Hakomori, S.** (1980). A new O-glycosidically linked tri-hexosamine core structure in sheep gastric mucin: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 92, 1143-50.
- Hounsell, E. F., Lawson, A. M. and Feizi, T.** (1982). Structural and antigenic diversity in mucin carbohydrate chains. *Adv Exp Med Biol* 144, 39-41.
- Hu, Y. P., Dalziel, M. and Lau, J. T.** (1997). Murine hepatic beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene expression involves usage of a novel upstream exon region. *Glycoconj J* 14, 407-11.
- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M. and Strahl, S.** (2008). Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* 68, 1438-49.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87.
- Ihara, H., Ikeda, Y., Toma, S., Wang, X., Suzuki, T., Gu, J., Miyoshi, E., Tsukihara, T., Honke, K., Matsumoto, A. et al.** (2007). Crystal structure of mammalian alpha1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 17, 455-66.
- Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T. et al.** (1999). Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine-alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* 9, 1213-24.
- Iver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L. and Boren, T.** (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373-7.
- Inoue, S. and Kitajima, K.** (2006). KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J* 23, 277-90.
- Irie, M., Nitta, K. and Nonaka, T.** (1998). Biochemistry of frog ribonucleases. *Cell Mol Life Sci* 54, 775-84.
- Ito, Y., Miyauchi, A., Yoshida, H., Uruno, T., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F. et al.** (2003). Expression of alpha1,6-fucosyltransferase (FUT8) in papillary carcinoma of the thyroid: its linkage to biological aggressiveness and anaplastic transformation. *Cancer Lett* 200, 167-72.
- Jadot, M., Lin, L., Sleat, D. E., Sohar, I., Hsu, M. S., Pintar, J., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. and Lobel, P.** (1999). Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* 274, 21104-13.
- Jaeken, J. and Matthijs, G.** (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 261-78.
- Jaeken, J., Schachter, H., Carchon, H., De Cock, P., Coddeville, B. and Spik, G.** (1994). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Arch Dis Child* 71, 123-7.
- Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y. and Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2, 423-30.
- Jamieson, J. C., McCaffrey, G. and Harder, P. G.** (1993). Sialyltransferase: a novel acute-phase reactant. *Comp Biochem Physiol B* 105, 29-33.
- Jann, O. C., Aerts, J., Jones, M., Hastings, N., Law, A., McKay, S., Marques, E., Prasad, A., Yu, J., Moore, S. S. et al.** (2006). A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. *BMC Genomics* 7, 283.
- Javaud Thèse 2002
- Javaud, C., Dupuy, F., Maftah, A., Michalski, J. C., Oriol, R., Petit, J. M. and Julien, R.** (2000). Ancestral exonic organization of FUT8, the gene encoding the alpha6-fucosyltransferase, reveals successive peptide domains which suggest a particular three-dimensional core structure for the alpha6-fucosyltransferase family. *Mol Biol Evol* 17, 1661-72.
- Jeanneau, C., Chazalet, V., Auge, C., Soumpasis, D. M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imberty, A. and Breton, C.** (2004). Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif. *J Biol Chem* 279, 13461-8.
- Jego, P., Joly, J. and Boisseau, C.** (1980). [Amphibian jelly envelopes (proteins secreted by the oviduct) and their role in fertilization]. *Reprod Nutr Dev* 20, 557-67.
- Jin, L., McLean, P. A., Neel, B. G. and Wortis, H. H.** (2002). Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. *J Exp Med* 195, 1199-205.

- Jordon, D., Jagirdar, J. and Kaneko, M.** (1989). Blood group antigens, Lewisx and Lewisy in the diagnostic discrimination of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Pathol* 135, 931-7.
- Julien, S., Grimshaw, M. J., Sutton-Smith, M., Coleman, J., Morris, H. R., Dell, A., Taylor-Papadimitriou, J. and Burchell, J. M.** (2007). Sialyl-Lewis(x) on P-selectin glycoprotein ligand-1 is regulated during differentiation and maturation of dendritic cells: a mechanism involving the glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal I. *J Immunol* 179, 5701-10.
- Julien, S., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M. A., Courtand, G., Le Bourhis, X. and Delannoy, P.** (2005). Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 90, 77-84.
- Jurado, L. A., Coloma, A. and Cruces, J.** (1999). Identification of a human homolog of the Drosophila rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 58, 171-80.
- Kabat, E. A.** (1956). Heterogeneity in extent of the combining regions of human antidextran. *J Immunol* 77, 377-85.
- Kakuta, Y., Okino, N., Kajiwara, H., Ichikawa, M., Takakura, Y., Ito, M. and Yamamoto, T.** (2008). Crystal structure of Vibronaceae Photobacterium sp. JT-ISH-224 alpha2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition. *Glycobiology* 18, 66-73.
- Kamemura, K., Hayes, B. K., Comer, F. I. and Hart, G. W.** (2002). Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem* 277, 19229-35.
- Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N. et al.** (1999). Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett* 452, 237-42.
- Kannagi, R.** (2002). Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* 12, 599-608.
- Kannagi, R.** (2004). Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J* 20, 353-64.
- Kanoh, Y., Ohara, T., Tadano, T., Kanoh, M. and Akahoshi, T.** (2008). Changes to N-linked oligosaccharide chains of human serum immunoglobulin G and matrix metalloproteinase-2 with cancer progression. *Anticancer Res* 28, 715-20.
- Kao, Y. H., Lee, G. F., Wang, Y., Starovasnik, M. A., Kelley, R. F., Spellman, M. W. and Lerner, L.** (1999). The effect of O-fucosylation on the first EGF-like domain from human blood coagulation factor VII. *Biochemistry* 38, 7097-110.
- Kaplan, H. A., Woloski, B. M., Hellman, M. and Jamieson, J. C.** (1983). Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *J Biol Chem* 258, 11505-9.
- Karlsson, K. A.** (1995). Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 5, 622-35.
- Kawashima, H.** (2006). Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol Pharm Bull* 29, 2343-9.
- Kean, E. L., Munster-Kuhnel, A. K. and Gerardy-Schahn, R.** (2004). CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 1673, 56-65.
- Kelly, R. J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G. G. and Lowe, J. B.** (1995). 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 the non-secretor phenotype. *J Biol Chem* 270, 4640-9.
- Kelly, W. G., Dahmus, M. E. and Hart, G. W.** (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268, 10416-24.
- Kim, D. U., Yoo, J. H., Lee, Y. J., Kim, K. S. and Cho, H. S.** (2008). Structural analysis of sialyltransferase PM0188 from Pasteurella multocida complexed with donor analogue and acceptor sugar. *BMB Rep* 41, 48-54.
- Kim, S. M., Lee, J. S., Lee, Y. H., Kim, W. J., Do, S. I., Choo, Y. K. and Park, Y. I.** (2007). Increased alpha2,3-sialylation and hyperglycosylation of N-glycans in embryonic rat cortical neurons during camptothecin-induced apoptosis. *Mol Cells* 24, 416-23.
- Kindberg, E., Hejdeman, B., Bratt, G., Wahren, B., Lindblom, B., Hinkula, J. and Svensson, L.** (2006). A nonsense mutation (428G-->A) in the fucosyltransferase FUT2 gene affects the progression of HIV-1 infection. *Aids* 20, 685-9.
- Kitagawa, H. and Paulson, J. C.** (1994). Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J Biol Chem* 269, 17872-8.
- Kitazume-Kawaguchi, S., Dohmae, N., Takio, K., Tsuji, S. and Colley, K. J.** (1999). The relationship between ST6Gal I Golgi retention and its cleavage-secretion. *Glycobiology* 9, 1397-406.
- Kleene, R. and Berger, E. G.** (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1154, 283-325.
- Kobata, A.** (1984). [The sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidase--changes induced by malignant transformation and their application for the diagnosis of hepatoma]. *Yakugaku Zasshi* 104, 823-38.
- Koda, Y., Ishida, T., Tachida, H., Wang, B., Pang, H., Soejima, M., Soemantri, A. and Kimura, H.** (2003). DNA sequence variation of the human ABO-secretor locus (FUT2) in New Guinean populations: possible early human migration from Africa. *Hum Genet* 113, 534-41.
- Kojima, N., Tachida, Y., Yoshida, Y. and Tsuji, S.** (1996). Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation. *J Biol Chem* 271, 19457-63.
- Kono, M., Yoshida, Y., Kojima, N. and Tsuji, S.** (1996). Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesizes GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. *J Biol Chem* 271, 29366-71.

- Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y. C., Hamamoto, T., Kojima, N. and Tsuji, S.** (1997). Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression. *Glycobiology* **7**, 469-79.
- Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C. and Canfield, W.** (1999). Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* **274**, 32778-85.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64.
- Kostova, Z. and Wolf, D. H.** (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* **22**, 2309-17.
- Krzewinski-Recchi, M. A., Julien, S., Juliant, S., Teinturier-Lelievre, M., Samyn-Petit, B., Montiel, M. D., Mir, A. M., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A. and Delannoy, P.** (2003). Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *Eur J Biochem* **270**, 950-61.
- Kukuruzinska, M. A. and Lennon-Hopkins, K.** (1999). ALG gene expression and cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 359-72.
- Kunkel, E. and Butcher, E.** (2002). Homeostatic chemokines and the targeting of regional immunity. *Adv Exp Med Biol* **512**, 65-72.
- Kyprianou, P., Betteridge, A., Donald, A. S. and Watkins, W. M.** (1990). Purification of the blood group H gene associated alpha-2-L-fucosyltransferase from human plasma. *Glycoconj J* **7**, 573-88.
- Larsen, R. D., Ernst, L. K., Nair, R. P. and Lowe, J. B.** (1990). Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6674-8.
- Lawrence, S. M., Huddleston, K. A., Pitts, L. R., Nguyen, N., Lee, Y. C., Vann, W. F., Coleman, T. A. and Betenbaugh, M. J.** (2000). Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *J Biol Chem* **275**, 17869-77.
- Leger, D. Y., Liagre, B., Corbiere, C., Cook-Moreau, J. and Beneytout, J. L.** (2004). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. *Int J Oncol* **25**, 555-62.
- Leppanen, A., Penttila, L., Renkonen, O., McEver, R. P. and Cummings, R. D.** (2002). Glycosulfopeptides with O-glycans containing sialylated and polyfucosylated polylactosamine bind with low affinity to P-selectin. *J Biol Chem* **277**, 39749-59.
- Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S. and Schlag, P. M.** (2002). Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* **276**, 101-10.
- Liu, C. K., Schmied, R., Scher, W. and Waxman, S.** (1981). Alterations in glycosyltransferase levels in mouse erythroleukemia cells during erythrodifferentiation and cell growth. *Cancer Res* **41**, 790-4.
- Livingston, B. D. and Paulson, J. C.** (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem* **268**, 11504-7.
- Lo, N. W., Dennis, J. W. and Lau, J. T.** (1999). Overexpression of the alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal I, in a low metastatic variant of a murine lymphoblastoid cell line is associated with appearance of a unique ST6Gal I mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 619-21.
- Lo, N. W. and Lau, J. T.** (1996). Transcription of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene in B lymphocytes is directed by a separate and distinct promoter. *Glycobiology* **6**, 271-9.
- Loriol, C., Dupuy, F., Rampal, R., Dlugosz, M. A., Haltiwanger, R. S., Maftah, A. and Germot, A.** (2006). Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology* **16**, 736-47.
- Lowe, J. B.** (2003). Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 531-8.
- Lowe, J. B., Stoolman, L. M., Nair, R. P., Larsen, R. D., Berhend, T. L. and Marks, R. M.** (1990). ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* **63**, 475-84.
- Lubas, W. A., Frank, D. W., Krause, M. and Hanover, J. A.** (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* **272**, 9316-24.
- Lubke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K. and Korner, C.** (2001). Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet* **28**, 73-6.
- Luhn, K., Laskowska, A., Pielage, J., Klambt, C., Ipe, U., Vestweber, D. and Wild, M. K.** (2004). Identification and molecular cloning of a functional GDP-fucose transporter in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* **301**, 242-50.
- Luhn, K., Marquardt, T., Harms, E. and Vestweber, D.** (2001). Discontinuation of fucose therapy in LADII causes rapid loss of selectin ligands and rise of leukocyte counts. *Blood* **97**, 330-2.
- Luo, Y. and Haltiwanger, R. S.** (2005). O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 11289-94.
- Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R. S. and Panin, V. M.** (2006a). Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type I repeats. *J Biol Chem* **281**, 9393-9.
- Luo, Y., Nita-Lazar, A. and Haltiwanger, R. S.** (2006b). Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type I repeats. *J Biol Chem* **281**, 9385-92.
- Ma, J. and Colley, K. J.** (1996). A disulfide-bonded dimer of the Golgi beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose. *J Biol Chem* **271**, 7758-66.
- Ma, J., Qian, R., Rausa, F. M., 3rd and Colley, K. J.** (1997). Two naturally occurring alpha2,6-sialyltransferase forms with a single amino acid change in the catalytic domain differ in their catalytic activity and proteolytic processing. *J Biol Chem* **272**, 672-9.

- Ma, B., Simala-Grant, J. L. and Taylor, D. E.** (2006). Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* **16**, 158R-184R.
- MacKenzie, C. R., Hirama, T., Lee, K. K., Altman, E. and Young, N. M.** (1997). Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **272**, 5533-8.
- Mahdavi, J., Boren, T., Vandenbroucke-Grauls, C. and Appelmek, B. J.** (2003). Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to the human gastric epithelium. *Infect Immun* **71**, 2876-80.
- Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C. E., Smith, P. L., Marks, R. M., Kelly, R. J., Gersten, K. M., Cheng, G., Saunders, T. L. et al.** (1996). The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* **86**, 643-53.
- Mancias, J. D. and Goldberg, J.** (2005). Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic* **6**, 278-85.
- Mandel, M. and Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-62.
- Marek, K. W., Vijay, I. K. and Marth, J. D.** (1999). A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* **9**, 1263-71.
- Marinaro, J. A., Casley, D. J. and Bach, L. A.** (2000). O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation. *Eur J Endocrinol* **142**, 512-6.
- Marquardt, T., Brune, T., Luhn, K., Zimmer, K. P., Korner, C., Fabritz, L., van der Werft, N., Vormoor, J., Freeze, H. H., Louwen, F. et al.** (1999). Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* **134**, 681-8.
- Martensson, S., Levery, S. B., Fang, T. T. and Bendiak, B.** (1998). Neutral core oligosaccharides of bovine submaxillary mucin--use of lead tetraacetate in the cold for establishing branch positions. *Eur J Biochem* **258**, 603-22.
- Martin, L. T., Marth, J. D., Varki, A. and Varki, N. M.** (2002). Genetically altered mice with different sialyltransferase deficiencies show tissue-specific alterations in sialylation and sialic acid 9-O-acetylation. *J Biol Chem* **277**, 32930-8.
- Martinez-Duncker, I., Dupre, T., Piller, V., Piller, F., Candelier, J. J., Trichet, C., Tchernia, G., Oriol, R. and Mollicone, R.** (2005). Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood* **105**, 2671-6.
- Martinez-Duncker, I., Mollicone, R., Candelier, J. J., Breton, C. and Oriol, R.** (2003). A new superfamily of protein-O-fucosyltransferases, alpha2-fucosyltransferases, and alpha6-fucosyltransferases: phylogeny and identification of conserved peptide motifs. *Glycobiology* **13**, 1C-5C.
- Mathieu, S., Gerolami, R., Luis, J., Carmona, S., Kol, O., Crescence, L., Garcia, S., Borentain, P. and El-Battari, A.** (2007). Introducing alpha(1,2)-linked fucose into hepatocarcinoma cells inhibits vasculogenesis and tumor growth. *Int J Cancer* **121**, 1680-9.
- Mathieu, S., Prorok, M., Benoliel, A. M., Uch, R., Langlet, C., Bongrand, P., Gerolami, R. and El-Battari, A.** (2004). Transgene expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase-I (FUT1) in tumor cells selectively inhibits sialyl-Lewis x expression and binding to E-selectin without affecting synthesis of sialyl-Lewis a or binding to P-selectin. *Am J Pathol* **164**, 371-83.
- McCurley, R. S., Recinos, A., 3rd, Olsen, A. S., Gingrich, J. C., Szczepaniak, D., Cameron, H. S., Krauss, R. and Weston, B. W.** (1995). Physical maps of human alpha (1,3)fucosyltransferase genes FUT3-FUT6 on chromosomes 19p13.3 and 11q21. *Genomics* **26**, 142-6.
- McDuffie, F. C. and Kabat, E. A.** (1956). The behavior in the Coombs test of anti-A and anti-B produced by immunization with various blood group A and B substances and by heterospecific pregnancy. *J Immunol* **77**, 61-71.
- Mercier, D., Wierinckx, A., Oulmouden, A., Gallet, P. F., Palcic, M. M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Petit, J. M., Leveziel, H. and Julien, R.** (1999). Molecular cloning, expression and exon/intron organization of the bovine beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase gene.
- Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. and Ashton, B. A.** (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853-60.
- Miller-Podraza, H., Bergstrom, J., Milh, M. A. and Karlsson, K. A.** (1997). Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid-dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates. *Glycoconj J* **14**, 467-71.
- Mitsuoka, C., Ohmori, K., Kimura, N., Kanamori, A., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M. and Kannagi, R.** (1999). Regulation of selectin binding activity by cyclization of sialic acid moiety of carbohydrate ligands on human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1597-602.
- Miyoshi, E., Noda, K., Yamaguchi, Y., Inoue, S., Ikeda, Y., Wang, W., Ko, J. H., Uozumi, N., Li, W. and Taniguchi, N.** (1999). The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 9-20.
- Mizuguchi, S., Nishiyama, N., Iwata, T., Nishida, T., Izumi, N., Tsukioka, T., Inoue, K., Kameyama, M. and Suehiro, S.** (2007). Clinical value of serum cytokeratin 19 fragment and sialyl-Lewis x in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* **83**, 216-21.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. and Paganetti, P.** (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* **299**, 1397-400.
- Molinari, M. and Helenius, A.** (1999). Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**, 90-3.
- Mollicone, R., Cailleau, A., Imberty, A., Gane, P., Perez, S. and Oriol, R.** (1996). Recognition of the blood group H type 2 trisaccharide epitope by 28 monoclonal antibodies and three lectins. *Glycoconj J* **13**, 263-71.
- Mollicone, R., Candelier, J. J., Mennesson, B., Couillin, P., Venot, A. P. and Oriol, R.** (1992). Five specificity patterns of alpha-L-fucosyltransferase activity defined by use of synthetic oligosaccharide acceptors. Differential expression of the enzymes during human embryonic development and in adult tissues. *Carbohydr Res* **228**, 265-76.
- Mollicone, R., Moore, S. E., Bovin, N., Garcia-Rosasco, M., Candelier, J. J., Martinez-Duncker, I. and Oriol, R.** (2009). Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J Biol Chem* **284**, 4723-38.

- Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L. and Haltiwanger, R. S. (2000). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* 275, 9604-11.
- Monnat, J., Neuhaus, E. M., Pop, M. S., Ferrari, D. M., Kramer, B. and Soldati, T. (2000). Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a Dictyostelium protein disulfide isomerase. *Mol Biol Cell* 11, 3469-84.
- Nair, P., Schaub, B. E., Huang, K., Chen, X., Murphy, R. F., Griffith, J. M., Geuze, H. J. and Rohrer, J. (2005). Characterization of the TGN exit signal of the human mannose 6-phosphate uncovering enzyme. *J Cell Sci* 118, 2949-56.
- Nakata, D., Close, B. E., Colley, K. J., Matsuda, T. and Kitajima, K. (2000). Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 642-8.
- Nakata, D., Zhang, L. and Troy, F. A., 2nd. (2006). Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. *Glycoconj J* 23, 423-36.
- Nakata, N., Furukawa, K., Greenwalt, D. E., Sato, T. and Kobata, A. (1993). Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac alpha 2-->6GalNAc beta 1-->4GlcNAc and the Man alpha 1-->2Man alpha 1-->3Man alpha 1-->6Man groups. *Biochemistry* 32, 4369-83.
- Newburg, D. S., Ruiz-Palacios, G. M. and Morrow, A. L. (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* 25, 37-58.
- Niehues, R., Hasilik, M., Alton, G., Korner, C., Schiebe-Sukumar, M., Koch, H. G., Zimmer, K. P., Wu, R., Harms, E., Reiter, K. et al. (1998). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 101, 1414-20.
- Niittymäki, J., Mattila, P., Roos, C., Huopaniemi, L., Sjöblom, S. and Renkonen, R. (2004). Cloning and expression of murine enzymes involved in the salvage pathway of GDP-L-fucose. *Eur J Biochem* 271, 78-86.
- Nilsson, T., Pypaert, M., Hoe, M. H., Slusarewicz, P., Berger, E. G. and Warren, G. (1993). Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *J Cell Biol* 120, 5-13.
- Nishihara, S., Iwasaki, H., Kaneko, M., Tawada, A., Ito, M. and Narimatsu, H. (1999). Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9; Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of poly-lactosamine chain while the other four alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue. *FEBS Lett* 462, 289-94.
- Nishihara, S., Iwasaki, H., Nakajima, K., Togayachi, A., Ikehara, Y., Kudo, T., Kushi, Y., Furuya, A., Shitara, K. and Narimatsu, H. (2003). Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) determines Lewis X expression in brain. *Glycobiology* 13, 445-55.
- Nishikawa, A., Nanda, A., Gregory, W., Frenz, J. and Kornfeld, S. (1999). Identification of amino acids that modulate mannose phosphorylation of mouse DNase I, a secretory glycoprotein. *J Biol Chem* 274, 19309-15.
- Nishimura, H., Kawabata, S., Kisiel, W., Hase, S., Ikenaka, T., Takao, T., Shimonishi, Y. and Iwanaga, S. (1989). Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl2-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. *J Biol Chem* 264, 20320-5.
- Nolte, D. and Müller, U. (2002). Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* 13, 62-4.
- Numahata, K., Satoh, M., Handa, K., Saito, S., Ohyama, C., Ito, A., Takahashi, T., Hoshi, S., Orikasa, S. and Hakomori, S. I. (2002). Sialosyl-Le(x) expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma. *Cancer* 94, 673-85.
- Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-7.
- Oguri, S., Minowa, M. T., Ihara, Y., Taniguchi, N., Ikenaga, H. and Takeuchi, M. (1997). Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: alpha1,3-D-mannoside beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetylglucosaminyltransferase-IV) from bovine small intestine. *J Biol Chem* 272, 22721-7.
- Okada, M., Itoh, M., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S. et al. (2002). b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem* 277, 1633-6.
- Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K. and Urano, T. (1999). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J Biol Chem* 274, 11479-86.
- O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Batista, F. D. and Neuberger, M. S. (1999). Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* 189, 1307-13.
- Okino, N., Kakuta, Y., Kajiwara, H., Ichikawa, M., Takakura, Y., Ito, M. and Yamamoto, T. (2007). Purification, crystallization and preliminary crystallographic characterization of the alpha 2,6-sialyltransferase from Photobacterium sp. JT-ISH-224. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 662-4.
- Olczak, M. and Watorek, W. (2000). Structural analysis of N-glycans from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seed diphosphonucleotide phosphatase/phosphodiesterase. *Biochim Biophys Acta* 1523, 236-45.
- Olivari, S., Cali, T., Salo, K. E., Paganetti, P., Ruddock, L. W. and Molinari, M. (2006). EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 1278-84.
- Oriol, R. (1990). Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet* 17, 235-45.

- Oriol, R., Candelier, J. J., Taniguchi, S., Balanzino, L., Peters, L., Niekrasz, M., Hammer, C. and Cooper, D. K. (1999a). Major carbohydrate epitopes in tissues of domestic and African wild animals of potential interest for xenotransplantation research. *Xenotransplantation* 6, 79-89.
- Oriol, R., Mollicone, R., Cailleau, A., Balanzino, L. and Breton, C. (1999b). Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology* 9, 323-34.
- Oriol, R., Samuelsson, B. E. and Messeter, L. (1990). ABO antibodies--serological behaviour and immuno-chemical characterization. *J Immunogenet* 17, 279-99.
- Orlandi, P. A., Klotz, F. W. and Haynes, J. D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol* 116, 901-9.
- Orntoft, T. F., Wolf, H. and Watkins, W. M. (1988). Activity of the human blood group ABO, Se, H, Le, and X gene-encoded glycosyltransferases in normal and malignant bladder urothelium. *Cancer Res* 48, 4427-33.
- Otipoby, K. L., Andersson, K. B., Draves, K. E., Klaus, S. J., Farr, A. G., Kerner, J. D., Perlmutter, R. M., Law, C. L. and Clark, E. A. (1996). CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* 384, 634-7.
- Oulmouden, A., Wierinckx, A., Petit, J. M., Costache, M., Palcic, M. M., Mollicone, R., Oriol, R. and Julien, R. (1997). Molecular cloning and expression of a bovine alpha(1,3)-fucosyltransferase gene homologous to a putative ancestor gene of the human FUT3-FUT5-FUT6 cluster. *J Biol Chem* 272, 8764-73.
- Pan, Y. T. and Elbein, A. D. (1990a). Oligosaccharide chains of glycoproteins. *Prog Drug Res* 34, 163-207.
- Pan, Y. T. and Elbein, A. D. (1990b). Control of N-linked oligosaccharide synthesis: cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor. *Biochemistry* 29, 8077-84.
- Park, E. I., Manzella, S. M. and Baenziger, J. U. (2003). Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 278, 4597-602.
- Patel, R. Y. and Balaji, P. V. (2006). Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. *Glycobiology* 16, 108-16.
- Paulson, J. C., Beranek, W. E. and Hill, R. L. (1977). Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose. *J Biol Chem* 252, 2356-62.
- Paulson, J. C., Weinstein, J. and Schauer, A. (1989). Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* 264, 10931-4.
- Pelham, H. R. (1996). The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* 21, 413-9.
- Petit, D., Maftah, A., Julien, R. and Petit, J. M. (2006). En bloc duplications, mutation rates, and densities of amino acid changes clarify the evolution of vertebrate alpha-1,3/4-fucosyltransferases. *J Mol Evol* 63, 353-64.
- Petitou, M., Duchaussoy, P., Lederman, I., Choay, J. and Sinay, P. (1988). Binding of heparin to antithrombin III: a chemical proof of the critical role played by a 3-sulfated 2-amino-2-deoxy-D-glucose residue. *Carbohydr Res* 179, 163-72.
- Pinho, S. S., Matos, A. J., Lopes, C., Marcos, N. T., Carnevalheira, J., Reis, C. A. and Gartner, F. (2007). Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BMC Cancer* 7, 124.
- Pochee, E., Litynska, A., Amoresano, A. and Casbarra, A. (2003). Glycosylation profile of integrin alpha 3 beta 1 changes with melanoma progression. *Biochim Biophys Acta* 1643, 113-23.
- Portugal, M. I., Todeschini, A. R., de Lima, C. S., Silva, C. A., Mohana-Borges, R., Ottenhoff, T. H., Mendonca-Previato, L., Previato, J. O. and Pessolani, M. C. (2008). Characterization of two heparan sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp. *BMC Microbiol* 8, 75.
- Powell, L. D., Sgroi, D., Sjoberg, E. R., Stamenkovic, I. and Varki, A. (1993). Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem* 268, 7019-27.
- Powell, L. D. and Varki, A. (1994). The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J Biol Chem* 269, 10628-36.
- Pratt, S. A., Scully, N. F. and Shur, B. D. (1993). Cell surface beta 1,4 galactosyltransferase on primary spermatocytes facilitates their initial adhesion to Sertoli cells in vitro. *Biol Reprod* 49, 470-82.
- Priatel, J. J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C. J., Richardson, K. B., Page, D. M., Fukuda, M., Varki, N. M. and Marth, J. D. (2000). The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 12, 273-83.
- Rabbani, S. A., Mazar, A. P., Bernier, S. M., Haq, M., Bolivar, I., Henkin, J. and Goltzman, D. (1992). Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *J Biol Chem* 267, 14151-6.
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B. and Dwek, R. A. (1988). Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 57, 785-838
- Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol* 20, 471-8.
- Rapoport, T. A., Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B. and Staack, O. (1999). Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143-50.
- Remacle, A. G., Chekanov, A. V., Golubkov, V. S., Savinov, A. Y., Rozanov, D. V. and Strongin, A. Y. (2006). O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Biol Chem* 281, 16897-905.
- Recchi, M. A., Harduin-Lepers, A., Boilly-Marer, Y., Verbert, A. and Delannoy, P. (1998). Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconj J* 15, 19-27.
- Reeder, J. C., Cowman, A. F., Davern, K. M., Beeson, J. G., Thompson, J. K., Rogerson, S. J. and Brown, G. V. (1999). The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5198-202.

- Reguigne-Arnould, I., Couillin, P., Mollicone, R., Faure, S., Fletcher, A., Kelly, R. J., Lowe, J. B. and Oriol, R.** (1995). Relative positions of two clusters of human alpha-L-fucosyltransferases in 19q (FUT1-FUT2) and 19p (FUT6-FUT3-FUT5) within the microsatellite genetic map of chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 71, 158-62.
- Rohfritsch, P. F., Joosten, J. A., Krzewinski-Recchi, M. A., Harduin-Lepers, A., Laporte, B., Juliant, S., Cerutti, M., Delannoy, P., Vliegthart, J. F. and Kamerling, J. P.** (2006). Probing the substrate specificity of four different sialyltransferases using synthetic beta-D-Galp-(1->4)-beta-D-GlcpNAc-(1->2)-alpha-D-Manp-(1->O) (CH₂)₇CH₃ analogues general activating effect of replacing N-acetylglucosamine by N-propionylglucosamine. *Biochim Biophys Acta* 1760, 685-92.
- Romano, S. J.** (2005). Selectin antagonists : therapeutic potential in asthma and COPD. *Treat Respir Med* 4, 85-94.
- Ronchetti, F., Villa, M. P., Ronchetti, R., Bonci, E., Latini, L., Pascone, R., Bottini, N. and Gloria-Bottini, F.** (2001). ABO/Secretor genetic complex and susceptibility to asthma in childhood. *Eur Respir J* 17, 1236-8.
- Roos, C., Kolmer, M., Mattila, P. and Renkonen, R.** (2002). Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism. *J Biol Chem* 277, 3168-75.
- Roth, J.** (2002). Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev* 102, 285-303.
- Rouquier, S., Lowe, J. B., Kelly, R. J., Fertitta, A. L., Lennon, G. G. and Giorgi, D.** (1995). Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J Biol Chem* 270, 4632-9.
- Rupp, R., Beaudeau, F. and Boichard, D.** (2000). Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. *Prev Vet Med* 46, 99-111.
- Sakamoto, S., Watanabe, T., Tokumaru, T., Takagi, H., Nakazato, H. and Lloyd, K. O.** (1989). Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 49, 745-52.
- Sakamoto, Y., Taguchi, T., Honke, K., Korekane, H., Watanabe, H., Tano, Y., Dohmae, N., Takio, K., Horii, A. and Taniguchi, N.** (2000). Molecular cloning and expression of cDNA encoding chicken UDP-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc): GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)-man α 1-R[GlcNAc to man] β 1,4N-acetylglucosaminyltransferase VI. *J Biol Chem* 275, 36029-34.
- Sanes, J. R.** (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278, 12601-4.
- Sarnesto, A., Kohlin, T., Thurin, J. and Blaszczyk-Thurin, M.** (1990). Purification of H gene-encoded beta-galactoside alpha 1----2 fucosyltransferase from human serum. *J Biol Chem* 265, 15067-75.
- Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N. and Nishi, T.** (1994). Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 14730-7.
- Sasaki, T., Yamada, H., Matsumura, K., Shimizu, T., Kobata, A. and Endo, T.** (1998). Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta* 1425, 599-606.
- Saunier, K., Barreaud, J. P., Eggen, A., Oriol, R., Leveziel, H., Julien, R. and Petit, J. M.** (2001). Organization of the bovine alpha 2-fucosyltransferase gene cluster suggests that the *Sec1* gene might have been shaped through a nonautonomous L1-retrotransposition event within the same locus. *Mol Biol Evol* 18, 2083-91.
- Schachter, H.** (1986). Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 64, 163-81.
- Schauer, R.** (1970). Studies on the subcellular site of the biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid in porcine submaxillary gland. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 351, 1353-8.
- Schnyder-Candrian, S., Borsig, L., Moser, R. and Berger, E. G.** (2000). Localization of alpha 1,3-fucosyltransferase VI in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8369-74.
- Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J. and Kresse, H.** (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 270, 2776-83.
- Schoop, H. J., Schauer, R. and Faillard, H.** (1969). [On the biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. Oxidative formation of N-glycolylneuraminic acid from N-acetylneuraminic acid]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 350, 155-62.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A. and Ehlers, M. D.** (2003). Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 45, 755-67.
- Seales, E. C., Jurado, G. A., Brunson, B. A., Wakefield, J. K., Frost, A. R. and Bellis, S. L.** (2005). Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 65, 4645-52.
- Sgroi, D., Varki, A., Braesch-Andersen, S. and Stamenkovic, I.** (1993). CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* 268, 7011-8.
- Shafi, R., Iyer, S. P., Ellies, L. G., O'Donnell, N., Marek, K. W., Chui, D., Hart, G. W. and Marth, J. D.** (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5735-9.
- Shao, L. and Haltiwanger, R. S.** (2003). O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. *Cell Mol Life Sci* 60, 241-50.
- Sharon, N.** (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* 1760, 527-37.
- Shur, B. D.** (1993). Glycosyltransferases as cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 5, 854-63.
- Silberstein, S. and Gilmore, R.** (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J* 10, 849-58.

- Sjoberg, E. R., Powell, L. D., Klein, A. and Varki, A.** (1994). Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol* 126, 549-62.
- Smith, P. L., Gersten, K. M., Petryniak, B., Kelly, R. J., Rogers, C., Natsuka, Y., Alford, J. A., 3rd, Scheidegger, E. P., Natsuka, S. and Lowe, J. B.** (1996). Expression of the alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII in lymphoid aggregate high endothelial venules correlates with expression of L-selectin ligands. *J Biol Chem* 271, 8250-9.
- Soejima, M. and Koda, Y.** (2005). Denaturing high-performance liquid chromatography-based genotyping and genetic variation of FUT2 in Sri Lanka. *Transfusion* 45, 1934-9.
- Spicer, A. P. and Tien, J. Y.** (2004). Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72, 89-108.
- Spiro, R. G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R-56R.
- Stasche, R., Hinderlich, S., Weise, C., Effertz, K., Lucka, L., Moormann, P. and Reutter, W.** (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272, 24319-24.
- Stegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B. and Vestweber, D.** (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 373, 615-20.
- Storry, J. R., Johannesson, J. S., Poole, J., Strindberg, J., Rodrigues, M. J., Yahalom, V., Levene, C., Fujita, C., Castilho, L., Hustinx, H. et al.** (2006). Identification of six new alleles at the FUT1 and FUT2 loci in ethnically diverse individuals with Bombay and Para-Bombay phenotypes. *Transfusion* 46, 2149-55.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. and Tanner, W.** (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426, 297-307.
- Strous, G. J. and Dekker, J.** (1992). Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27, 57-92.
- Stubbs, H. J., Lih, J. J., Gustafson, T. L. and Rice, K. G.** (1996). Influence of core fucosylation on the flexibility of a biantennary N-linked oligosaccharide. *Biochemistry* 35, 937-47.
- Takahashi, T., Ikeda, Y., Tateishi, A., Yamaguchi, Y., Ishikawa, M. and Taniguchi, N.** (2000). A sequence motif involved in the donor substrate binding by alpha1,6-fucosyltransferase: the role of the conserved arginine residues. *Glycobiology* 10, 503-10.
- Takashima, S.** (2008). Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1155-67.
- Takashima, S., Tsuji, S. and Tsujimoto, M.** (2002). Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. Genomic analysis of human sialyltransferase genes. *J Biol Chem* 277, 45719-28.
- Takashima, S., Tsuji, S. and Tsujimoto, M.** (2003). Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. *J Biochem* 134, 287-96.
- Taniguchi, A., Hasegawa, Y., Higai, K. and Matsumoto, K.** (2000a). Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology* 10, 623-8.
- Taniguchi, A., Suga, R. and Matsumoto, K.** (2000b). Expression and transcriptional regulation of the human alpha1, 3-fucosyltransferase 4 (FUT4) gene in myeloid and colon adenocarcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 370-6.
- Taniguchi, K., Kobayashi, K., Saito, K., Yamanouchi, H., Ohnuma, A., Hayashi, Y. K., Manya, H., Jin, D. K., Lee, M., Parano, E. et al.** (2003). Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12, 527-34.
- Tanner, W. and Lehle, L.** (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 906, 81-99.
- Teinturier-Lelievre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cerutti, M., Delannoy, P. and Harduin-Lepers, A.** (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem J* 392, 665-74.
- Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A. and Tabak, L. A.** (2003). All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13, 1R-16R.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. and Ernst, J. F.** (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273, 20837-46.
- Tonetti, M., Sturla, L., Bisso, A., Benatti, U. and De Flora, A.** (1996). Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *J Biol Chem* 271, 27274-9.
- Torres, C. R. and Hart, G. W.** (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259, 3308-17.
- Trombetta, E. S. and Helenius, A.** (2000). Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 148, 1123-29.
- Tsuji, S., Datta, A. K. and Paulson, J. C.** (1996). Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* 6, v-vii.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R. and Kiso, M.** (2003). Synthesis of disialyl Lewis x (Le(a)) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase, ST6GalNAc VI, responsible for the synthesis of alpha-series gangliosides. *J Biol Chem* 278, 22787-94.
- Tu, L., Delahunty, M. D., Ding, H., Luscinskas, F. W. and Tedder, T. F.** (1999). The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 189, 241-52.

- Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Horiuchi, M., Inagaki, F., Igarashi, Y. and Inokuchi, J. (2006). Substitution of the N-glycan function in glycosyltransferases by specific amino acids: ST3Gal-V as a model enzyme. *Glycobiology* 16, 258-70.
- Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C. X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T. and Taniguchi, N. (1996). Purification and cDNA cloning of porcine brain GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha1-->6fucosyltransferase. *J Biol Chem* 271, 27810-7.
- Vallejo-Ruiz, V., Haque, R., Mir, A. M., Schwientek, T., Mandel, U., Cacan, R., Delannoy, P. and Harduin-Lepers, A. (2001). Delineation of the minimal catalytic domain of human Galbeta1-3GalNAc alpha2,3-sialyltransferase (hST3Gal I). *Biochim Biophys Acta* 1549, 161-73.
- Van der Merwe, P. A., Crocker, P. R., Vinson, M., Barclay, A. N., Schauer, R. and Kelm, S. (1996). Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. *J Biol Chem* 271, 9273-80.
- Van Schaftingen, E. and Jaeken, J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett* 377, 318-20.
- Vanderslice, P., Biediger, R. J., Woodside, D. G., Berens, K. L., Holland, G. W. and Dixon, R. A. (2004). Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 17, 1-10.
- Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 446, 1023-9.
- Varki, A. (2008). Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J*.
- Varki, N. M. and Varki, A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 87, 851-7.
- Veach, Y. K., Martin, R. C., Mok, D. W., Malbeck, J., Vankova, R. and Mok, M. C. (2003). O-glycosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol* 131, 1374-80.
- Vijay, I. K. (1998). Developmental and hormonal regulation of protein N-glycosylation in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 325-36.
- Vliegenthart, J. F. and Casset, F. (1998). Novel forms of protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 8, 565-71.
- Walch, L. and Morris, P. L. (2002). Cyclooxygenase 2 pathway mediates IL-1beta regulation of IL-1alpha, -1beta, and IL-6 mRNA levels in Leydig cell progenitors. *Endocrinology* 143, 3276-83.
- Wang, P. H., Li, Y. F., Juang, C. M., Lee, Y. R., Chao, H. T., Tsai, Y. C. and Yuan, C. C. (2001). Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecol Oncol* 83, 121-7.
- Wang, X., Vertino, A., Eddy, R. L., Byers, M. G., Jani-Sait, S. N., Shows, T. B. and Lau, J. T. (1993). Chromosome mapping and organization of the human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Differential and cell-type specific usage of upstream exon sequences in B-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem* 268, 4355-61.
- Wang, Y., Lee, G. F., Kelley, R. F. and Spellman, M. W. (1996). Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* 6, 837-42.
- Wang, B. L., Springer, G. F. and Carlstedt, S. C. (1997). Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 45, 1393-400.
- Webb, G. F. and Blaser, M. J. (2002). Dynamics of bacterial phenotype selection in a colonized host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3135-40.
- Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H. and Paulson, J. C. (1987). Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor. *J Biol Chem* 262, 17735-43.
- Wen, D. X., Svensson, E. C. and Paulson, J. C. (1992). Tissue-specific alternative splicing of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. *J Biol Chem* 267, 2512-8.
- Wierinckx, A., Mercier, D., Oulmouden, A., Petit, J. M. and Julien, R. (1999). Complete genomic organization of futb encoding a bovine alpha 3-fucosyltransferase: exons in human orthologous genes emerged from ancestral intronic sequences. *Mol Biol Evol* 16, 1535-47.
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. and Strahl, S. (2002). Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 12, 771-83.
- Williams, J. L., Eggen, A., Ferretti, L., Farr, C. J., Gautier, M., Amati, G., Ball, G., Caramorr, T., Critcher, R., Costa, S. et al. (2002). A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mamm Genome* 13, 469-74.
- Wuensch, S. A., Huang, R. Y., Ewing, J., Liang, X. and Lau, J. T. (2000). Murine B cell differentiation is accompanied by programmed expression of multiple novel beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase mRNA forms. *Glycobiology* 10, 67-75.
- Xu, G., Horiike, G., Suzuki, T., Miyamoto, D., Kumihashi, H. and Suzuki, Y. (1996). A novel strain, B/Gifu/2/73, differs from other influenza B viruses in the receptor binding specificities toward sialo-sugar chain linkage. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 815-8.
- Xu, G., Suzuki, T., Tahara, H., Kiso, M., Hasegawa, A. and Suzuki, Y. (1994). Specificity of sialyl-sugar chain mediated recognition by the hemagglutinin of human influenza B virus isolates. *J Biochem* 115, 202-7.
- Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T. and Kitajima, K. (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* 278, 13875-80.
- Yamauchi, M., Noyes, C., Kuboki, Y. and Mechanic, G. L. (1982). Collagen structural microheterogeneity and a possible role for glycosylated hydroxylysine in type I collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7684-8.
- Yanagidani, S., Uozumi, N., Ihara, Y., Miyoshi, E., Yamaguchi, N. and Taniguchi, N. (1997). Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide:alpha1-6 fucosyltransferase (alpha1-6 FucT) from human gastric cancer MKN45 cells. *J Biochem* 121, 626-32.
- Yasukawa, Z., Sato, C. and Kitajima, K. (2005). Inflammation-dependent changes in alpha2,3-, alpha2,6-, and alpha2,8-sialic acid glycotopes on serum glycoproteins in mice. *Glycobiology* 15, 827-37.

- Yip, G. W., Smollich, M. and Gotte, M.** (2006). Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther* **5**, 2139-48.
- Young 2003
- Yoshida, Y., Kojima, N. and Tsuji, S.** (1995). Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung. *J Biochem* **118**, 658-64.
- Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y. and Taniguchi, N.** (1996). Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *J Biol Chem* **271**, 13811-5.
- Zhao, Y., Itoh, S., Wang, X., Isaji, T., Miyoshi, E., Kariya, Y., Miyazaki, K., Kawasaki, N., Taniguchi, N. and Gu, J.** (2006). Deletion of core fucosylation on alpha3beta1 integrin down-regulates its functions. *J Biol Chem* **281**, 38343-50.
- Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J. and Taniguchi, N.** (2008). Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *Febs J* **275**, 1939-48.
- Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A. and Roth, J.** (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* **267**, 9965-71.