



**HAL**  
open science

# Recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les enzymes de biosynthèse des glycosaminoglycanes

Mineem Saliba

## ► To cite this version:

Mineem Saliba. Recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les enzymes de biosynthèse des glycosaminoglycanes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0182 . tel-01754608

**HAL Id: tel-01754608**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754608>**

Submitted on 30 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## **Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

### **Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

Par Mineem SALIBA

### **RECHERCHE DE NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CIBLANT LES ENZYMES DE BIOSYNTHÈSE DES GLYCOSAMINOGLYCANES**

**Le 15 Décembre 2015**

#### **Membres du jury :**

Rapporteurs      Professeur Abderrahman MAFTAH, PR, UMR 1061 INRA-Université de Limoges  
Docteur Romain VIVES, DR CNRS, Institut de Biologie Structurale, Grenoble

Examineurs      Docteur Chrystel LOPIN-BON, MCU, UMR 7311 CNRS-Université d'Orléans  
Docteur Eric BATTAGLIA, MCU, UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine  
Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, DR INSERM, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, directeur de thèse  
Docteur Nick RAMALANJAONA, MCU, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Co-directeur de thèse

**Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire – IMoPA – UMR 7365 CNRS – UL – Biopôle, Equipe 2 : Ingénierie Moléculaire, Cellulaire, Thérapeutique & Glycosyltransférases, Campus Biologie – Santé – Faculté de Médecine. CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy**

## ***Remerciements***

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX pour avoir dirigé cette thèse. Je tiens particulièrement à la remercier de la liberté d'action et de la confiance qu'elle m'a accordées pour ce travail, en espérant que le résultat soit finalement à la hauteur de ses espérances.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Monsieur le Docteur Nick RAMALANJONA qui a co-encadré ce travail de thèse. Merci pour son soutien, ses précieux conseils ainsi que pour nos discussions. Merci également pour le temps consacré à la correction de ce manuscrit et toute son implication dans mon travail.

Je souhaite également remercier Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU, pour son accueil au sein de son laboratoire, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Abderrahman MAFTAH, tout d'abord pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur, mais également pour ses remarques constructives en tant que membre de mon comité de thèse.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Docteur Romain VIVES, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse en qualité de rapporteur.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Docteur Éric BATTAGLIA pour sa contribution dans mon comité de thèse et pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

J'exprime mes remerciements à Madame le Docteur Chrystel LOPIN-BON pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur et pour sa contribution aux travaux de l'équipe MolCelTEG.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Monsieur le Docteur Mohamed OUZZINE, pour ses précieux conseils et pour ses idées scientifiques toujours efficaces.

Je remercie l'ensemble des personnes croisées au sein du laboratoire pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mon père qui m'a toujours épaulé dans ce projet. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, son intelligence, sa confiance, sa tendresse, son amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je te dois beaucoup.

# *Sommaire*

# Sommaire

Liste des illustrations .....	9
Liste des abréviations .....	13
Avant-propos.....	17
Introduction bibliographique .....	21
<b>Chapitre I : Les protéoglycanes : structure, classification et fonctions biologiques .....</b>	<b>22</b>
I.1- Propriétés structurales et fonctionnelles des protéoglycanes .....	22
I.2-Classification des protéoglycanes .....	25
I.2.1 - Les protéoglycanes extracellulaires .....	25
I.2.1.1 - Les protéoglycanes extracellulaires de grande taille : exemple de l'agrécan.....	28
I.2.1.2 - Les protéoglycanes de petite taille : exemple des SLRPs (small leucine rich proteoglycans).....	29
I.2.2- Les protéoglycanes membranaires : exemple des syndécanes .....	33
I.2.3- Les protéoglycanes intracellulaires : exemple de la serglycine .....	38
I.2.4- Les protéoglycanes circulants : exemple de l'endocane .....	39
<b>ChapitreII : Les glycosaminoglycanes.....</b>	<b>40</b>
II.1- Généralités sur les chaînes de GAG .....	40
II. 2 - Biosynthèse et maturation des chaînes de GAG .....	42
II. 2.1 - Biosynthèse de la séquence tétrasaccharidique commune aux principales chaînes de GAG .....	42
II. 2.2 – Élongation et maturation des chaînes de Sulfates de chondroïtine et de dermatane .....	44
II. 2.2.1 – Élongation des chaînes de Sulfates de Chondroïtine/Dermatane	44
II. 2.2.2 – Maturation des chaînes de Sulfates de Chondroïtine/Dermatane	44
II. 2.3 – Élongation et maturation des chaînes de sulfates d'héparanes/Héparine ....	47
II. 2.3.1 – Élongation des chaînes de sulfates d'héparanes/Héparine.....	47
II. 2.3.2 – Maturation des chaînes de sulfates d'héparanes/héparine .....	49
II. 2.3.2.1 – N-désacétylation/N-sulfatation des chaînes de sulfates d'héparanes/héparine.....	49
II. 2.3.2.2 – C5 épimérisation de l'acide glucuronique.....	51
II. 2.3.2.3 – Le processus de 2-O-sulfatation.....	52
II. 2.3.2.4 – Le processus de 6-O-sulfatation.....	53
II. 2.3.2.5 – Le processus de 3-O-sulfatation .....	54
<b>Chapitre III : Les glycosyltransférases.....</b>	<b>57</b>
III.1 – Généralités .....	57
III.2 - Classification des glycosyltransférases .....	57
III.2.1- Classification selon le repliement structural des glycosyltransférases .....	57
III.2.1.1 - Le repliement GT-A .....	57

III.2.1.2 - Le repliement GT-B .....	58
III.2.2 - Classification selon le mécanisme catalytique .....	60
III.3 - Les galactosyltransférases.....	61
III.3.1 – Généralités .....	61
III.3.2 - La famille des $\beta$ 4GalTs .....	61
III.3.3 - La $\beta$ 4GalT7 .....	63
III.3.3.1 – Généralités .....	63
III.3.3.2 - Analyse génomique de la $\beta$ 4GalT7 .....	64
III.3.3.3 - Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la $\beta$ 4GalT7 chez la drosophile ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) .....	65
III.3.3.4 – Structure tridimensionnelle de la $\beta$ 4GalT7 humaine .....	67
III.3.3.5- La $\beta$ 4GalT7 et le Syndrome d'Ehlers-Danlos .....	70
<b>Chapitre IV- Modulation des voies de biosynthèse des chaînes de GAGs par des xylosides exogènes.....</b>	<b>74</b>
IV.1 – Historique du développement des composés $\beta$ -D-xylosidiques .....	74
IV.2 - Les composés $\beta$ -D-xylosidiques dans le cadre de la réparation du cartilage articulaire.....	76
IV.3 - Les composés $\beta$ -D-xylosidiques et la régénération/réparation de la peau .....	77
IV.4 - Les composés $\beta$ -D-xylosidiques et le cancer .....	79
IV.5 – Bilan de l'utilisation de dérivés xylosidiques .....	81
<b>Présentation de l'étude .....</b>	<b>83</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>87</b>
Chapitre I : Les matériels .....	88
I.1 - Les réactifs chimiques et biochimiques .....	88
I.2 - Les lignées cellulaires et les milieux utilisés cultures cellulaires .....	88
I.3 - Les réactifs de biologie moléculaire .....	89
Chapitre II - Méthodes expérimentales .....	90
II.1 - Clonage de la $\beta$ 4GalT7 et construction des vecteurs d'expression .....	90
II.1.1 - Construction du vecteur d'expression pcDNA- $\beta$ 4GalT7 .....	91
II.1.2 - Construction du vecteur d'expression pET- $\beta$ 4GalT7 .....	91
II.2 - Mutagenèse dirigée .....	91
II.3 - Amplification et extraction d'ADN plasmidiques .....	93
II.4 - Expression et purification de la $\beta$ 4GalT7 sous forme soluble dans les bactéries E. coli BL21.....	95
II.4.1- Clivage de la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 par l'entérokinase.....	96
II.5 - Expression transitoire de la $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée dans les cellules CHO-pgsB618 .....	96
II.5.1 Dosage des protéines totales .....	97
II.5.2-Analyse de l'expression des protéines par western-blot.....	98
II.5.3- Mesure de l'activité enzymatique par HPLC (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) en phase inverse et détermination des constantes cinétiques ( $K_m$ et $k_{cat}$ ).....	98



II.5.4- Analyse de la biosynthèse des chaînes de GAG à partir du xyloside exogène 4-MOX par incorporation du Na <sub>2</sub> [ <sup>35</sup> SO <sub>4</sub> ] .....	99
II.5.5- Analyse du niveau de glycanation de la protéine-core d'un PG modèle, la décorine, par Western-Blot .....	100
II.6- Inhibition de l'activité enzymatique de la β4GalT7 par des xylosides ... ..	101
II.6.1- Analyse de l'inhibition de la biosynthèse des chaînes de GAG par des xylosides .....	101
II.6.2- Analyse par immunoblot de l'inhibition de la glycosylation de la décorine par des xylosides .....	102
II.7- Test de viabilité cellulaire .....	102
II.8- Test de prolifération cellulaire .....	102
<b>Résultats .....</b>	<b>104</b>
I – Production, purification et caractérisation cinétique des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86 .....	105
I.1- Expression et purification des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86 dans la bactérie E. coli .....	105
I.2- Détermination des paramètres cinétiques des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86.....	106
I.3- Étude de l'influence du domaine GST sur l'activité enzymatique du domaine catalytique de la β4GalT7ΔNt-60 .....	108
I.4- Effet des tampons sur la stabilité thermodynamique et sur la solubilité de la β4GalT7ΔNt-60 en vue d'une étude structurale par cristallographie .....	110
I.4.1- Étude de la solubilité de la β4GalT7ΔNt-60 par diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	110
I.4.2- Etude de la stabilité thermique de la β4GalT7 purifiée dans différents tampons par la technique de « Thermal Shift Assay » (TSA).....	111
II- Recherche des résidus d'acides aminés potentiellement impliqués dans la reconnaissance et la fixation du substrat accepteur de la β4GalT7 humaine.....	113
II.1- Modélisation moléculaire du site de fixation du substrat xylosidique de la ...	113
III- Étude in vitro de l'impact des mutations aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270 sur le comportement cinétique de la β4GalT7 recombinante humaine ....	116
III.1- Expression et purification de la β4GalT7 recombinante humaine sauvage ou mutée aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270 .....	116
III.2- Détermination des paramètres cinétiques de la β4GalT7 recombinante humaine sauvage ou mutée aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270 vis-à-vis de l'UDP-Gal et du 4-MOX .....	117
IV- Étude ex vivo de l'impact des mutations affectant la séquence de la β4GalT7 sur le taux de synthèse des GAGs .....	121
IV.1 – Évaluation des effets des mutations aux positions 194, 195, 196, 199, 226 et 270 sur la biosynthèse des chaînes de GAG dans les cellules CHO-pgsB618 .....	121
IV.2- Étude de l'impact des mutations de la β4GalT7 sur le niveau de glycosylation de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618 .....	124
V- Inhibition de l'activité galactosyltransférase de la β4GalT7 par des xylosides modifiés dans	

des conditions in vitro et in cellulo .....	125
V.1- Évaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur l'activité galactosyltransférase in vitro .....	126
V.2- Évaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur le taux de biosynthèse des chaînes de GAG dans les cellules CHO-pgsB618 .....	127
V.3- Évaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur la glycosylation de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618 exprimant la $\beta$ 4GalT7 .....	128
VI- Effets cellulaires du 4F-MOX sur les lignées cancéreuses .....	129
VI.1- Étude de l'effet cytotoxique du 4-MOX et du 4F-MOX sur les lignées cellulaires : CHO-pgsB618, MDA-MB231 et SW1353.....	130
VI.2- Évaluation de la capacité du 4F-MOX à inhiber la synthèse des chaînes de GAG dans les cellules tumorales MDA MB-231 et SW1353 .....	132
VI.3- Étude de l'effet du 4F-MOX sur la prolifération des cellules cancéreuses .....	133
<b>Discussion .....</b>	<b>135</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>142</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>147</b>

# *Liste des illustrations*

## Liste des illustrations

### Figures

- Figure 1 (page 24): Schéma illustrant les différentes fonctions des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) des protéoglycanes
- Figure 2 (page 28): Représentation schématique de la structure des agrégats d'agrécane sur l'acide hyaluronique au niveau du cartilage
- Figure 3 (page 30): Implication des SLRPs (*small leucine rich proteoglycans*) comme la décorine, le biglycane et le lumicane dans les voies de signalisation
- Figure 4 (page 31): Rôle de la décorine dans l'organisation structurale du réseau collagénique dans les MEC
- Figure 5 (page 31): Interactome de la décorine
- Figure 6 (page 34): Représentation schématique des différents types de syndécanes
- Figure 7 (page 35): Vue d'ensemble de l'implication des syndécanes dans le processus tumoral
- Figure 8 (page 41): Motifs disaccharidiques des différents GAGs et leurs modifications
- Figure 9 (page 42): Représentation schématique de la voie principale de synthèse des glycosaminoglycanes
- Figure 10 (page 46): Représentation schématique de la polymérisation et des modifications des chaînes de CS/DS
- Figure 11 (page 51): Représentation schématique de la polymérisation et des modifications des chaînes de HS/Hp
- Figure 12 (page 59): Les deux principaux types de repliements des GTs
- Figure 13 (page 60): Mécanisme de la réaction catalysée par les GTs
- Figure 14 (page 63): Organisation modulaire et membranaire des enzymes de la famille des  $\beta$ 4GalTs
- Figure 15 (page 64): Représentation schématique de la réaction enzymatique catalysée par la  $\beta$ 4GalT7 humaine
- Figure 16 (page 66) : Structure cristallographique du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 de drosophile montrant le site de fixation du manganèse et de l'UDP
- Figure 17 (page 67) : Ancrage de la molécule du glucose dans le site accepteur du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile

Figure 18 (page 68): Structure cristalline de la  $\beta$ 4GalT7 humaine

Figure 19 (page 69): Superposition de la structure 3D de la  $\beta$ 4GalT7 humaine sous ses deux conformations ouverte et fermée

Figure 20 (page 69): Visualisation du potentiel électrostatique de la  $\beta$ 4GalT7

Figure 21 (page 106): Expression et purification des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86

Figure 22 (page 107): Détermination des paramètres cinétiques de la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86 vis-à-vis du substrat accepteur

Figure 23 (page 108): Expression, clivage et purification de GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60

Figure 24 (page 109): Constantes cinétiques des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 vis-à-vis du substrat accepteur

Figure 25 (page 110): Spectres de diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60

Figure 26 (page 111): Courbe de dénaturation thermique de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 déterminées par *Thermal Shift Assay* (TSA) en fonction de la nature du tampon et du pH

Figure 27 (page 114): Analyse structurale de l'entrée de la poche du site de fixation du substrat accepteur

Figure 28 (page 115): Modélisation moléculaire du site actif de la  $\beta$ 4GalT7

Figure 29 (page 117): Expression et purification de la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 sauvage et mutée dans la bactérie

Figure 30 (page 121): Analyse de l'expression de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage et mutée par immunoblot

Figure 31 (page 122): Analyse de la glycosylation de la  $\beta$ 4GalT7 dans les cellules CHO-pgsB618

Figure 32 (page 123): Analyse du taux de synthèse des chaînes de GAG en fonction de la concentration en substrat accepteur 4-MOX

Figure 33 (page 125): Effet de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée sur la glycosylation de la protéine *core* de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618

Figure 34 (page 126): Structure chimique des xylosides modifiés

Figure 35 (page 127): Paramètres cinétiques de l'inhibition de la  $\beta$ 4GalT7 par les xylosides modifiés

Figure 36 (page 128): Inhibition de la synthèse des chaînes de GAG sur les cellules CHO-pgsB618

Figure 37 (page 129): Inhibition de la glycosylation de la décorine par des xylosides exogènes

Figure 38 (page 133): Quantification des chaînes de GAG néosynthétisées dans les cellules MDA- MB231 et SW1353

Figure 39 (page 134) : Evaluation de l'inhibition de la prolifération cellulaire par le 4F-MOX

### **Tableaux**

Tableau 1 (page 27): Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation cellulaire

Tableau 2 (page 90) : Séquence utilisée dans le cadre de la programmation d'un cycle PCR.

Tableau 3 (page 93): Séquences sens et antisens des amorces nucléotidiques utilisées pour réaliser la mutagenèse dirigée

Tableau 4 (page 107): Constantes cinétiques des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86 vis-à-vis du substrat accepteur 4-MOX

Tableau 5 (page 109): Constantes cinétiques des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 vis-à-vis du substrat accepteur

Tableau 6 (page 112): Température de fusion ( $T_m$ ) de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 déterminée par *Thermal Shift Assay* (TSA) en fonction de la nature du tampon et du pH

Tableau 7 (page 120): Constantes cinétiques de la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 sauvage et mutée vis-à-vis des substrats donneur et accepteur en condition de vitesse initiale

Tableau 8 (page 131): Évaluation de la cytotoxicité du 4-MOX et du 4F-MOX sur lignées cellulaires (MDA MB231, SW 1353 et CHO-pgsB618)

# *Liste des abréviations*

## Liste des abréviations

ACN	ACétoNitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AH	Acide hyaluronique
ApoO	Apolipoprotéine O
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BGN	Biglycan
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
CMP	Cytidine MonoPhosphate
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>
CS	Chondroïtine sulfate
CSPG	ProtéoGlycanes à Chondroïtine Sulfates
DCN	Décorine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DS	Dermatane sulfate
<i>E .coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor receptor</i>
GAGs	Glycosaminoglycanes
Gal	Galactose
GalNAc	N-AcétylGalactosamine
GDP	Guanosine DiPhosphate
Glc	Glucose



GlcA	Acide Glucuronique
GlcAT-I	$\beta$ 1,3-Glucuronosyltransférase
GlcNAc	N-AcétyleGlucosamine
GPC	Glypicane
GPI	Glycosyl-PhosphatidyInositol
GST	Glutathion-S-Transférase
HEPES	Tris [hydroxyméthyl]aminoéthane, acide N-(2HydroxyEthyl)Pipérazine- N'-(2- Ethane) Sulfonique
Hh	Hedgehog
Hp	Héparine
HS	Héparane sulfate
HSPG	ProtéoGlycanes à Héparane Sulfates
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
IdoA	Acide Iduronique
IgG	Immunoglobuline classe G
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-galactopyranoside
JNK	<i>c-JUN N-terminal Kinase</i>
KO	<i>Knock-out</i>
KS	Kératane sulfate
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LP	<i>Link Protein</i>
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LUM	Lumicane
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MCSF-1	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MOPS	acide N-MOrpholino-3-Propane Sulfonique
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PG	Protéoglycane

PKC	Protéine Kinase C
PMSF	PhénylMéthylSulfonylFluoride
PRELP	<i>Proline/arginine-Rich End Leucine-rich repeat Protein</i>
PVDF	PolyVinylidène DiFluorure
RE	Réticulum Endoplasmique
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SED	Syndrome D'Ehlers-Danlos
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel
SLRP	<i>Small Leucine Rich Proteoglycan</i>
ST	Sulfotransférase
SVF	Serum de Veau Foetal
TBST	<i>Tris Buffer Saline Tween</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Epidermal Growth Factor</i>
Wnt	<i>Wingless integration site</i>
Xyl	Xylose
XylT	XylosylTransférase
$\beta$ 3GalT	$\beta$ 1,3-Galactosyltransférase
$\beta$ 4GalT	$\beta$ 1,4-Galactosyltransférase
3D	Tridimensionnel
4F-MOX	4-MéthylOmbélliférone-7- $\beta$ -D-4F-Xyloside
4H-MOX	4-MéthylOmbélliférone-7- $\beta$ -D-4H-Xyloside
4H-Xyl-NP	4-Hydroxy-Xylose-Naphtyl
4-MOX	4-MéthylOmbélliférone-7- $\beta$ -D-Xyloside

# *Avant-propos*

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus conjonctifs. Fonctionnant comme régulateurs de nombreux facteurs de croissance et autres médiateurs solubles, ils sont capables de moduler de multiples fonctions biologiques comme la migration et la prolifération cellulaires. Dans des tissus conjonctifs comme le cartilage, les PGs confèrent à ce tissu des propriétés biomécaniques particulières (en étroite relation avec le réseau collagénique), lui permettant, entre autres, de résister aux forces de compression qui s'exercent au niveau de l'articulation. Toutes ces propriétés sont liées à la double nature biochimique des PGs, qui sont constitués d'une partie protéique (protéine porteuse ou protéine *core*) sur laquelle sont attachées de façon covalente des chaînes polysaccharidiques linéaires nommées glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont constitués de la répétition d'unités disaccharidiques composées d'un monosaccharide acide et d'un ose aminé (par exemple, l'acide glucuronique (GlcA) et la N-acétylgalactosamine (GalNAc) respectivement). Quatre grands groupes de GAGs peuvent être distingués sur la base de leur composition en oses et de la nature de la liaison osidique entre les unités du motif disaccharidique : (1) l'acide hyaluronique (AH), seul GAG non lié à une protéine porteuse, (2) les sulfates de chondroïtine (CS) /sulfates de dermatane (DS), (3) les sulfates d'héparane (HS) et l'héparine (Hp), (4) les sulfates de kératane (KS). La biosynthèse des PGs implique de nombreuses enzymes de la famille des glycosyltransférases (GTs) qui vont glycosyler la protéine porteuse dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Les chaînes de GAGs en cours de synthèse sont modifiées et maturées de façon co- et post-traductionnelle par toute une série d'enzymes telles que les sulfotransférases (STs) ou les épimérasés qui augmentent d'autant plus la complexité structurale et fonctionnelle des GAGs. Les GAGs sont des acteurs importants à considérer dans un contexte pathologique dans la mesure où ils ont été associés à de nombreuses pathologies notamment tumorales, dégénératives et génétiques. Les HS présentent en particulier la capacité de réguler la biodisponibilité et donc l'activité de certains facteurs de croissance, comme le *fibroblast growth factor* (FGF), en interagissant avec ce dernier et son récepteur, le FGFR (*fibroblast growth factor receptor*). De par ces propriétés régulatrices et leur grande capacité d'interactions avec de multiples effecteurs protéiques, les chaînes de GAG représentent donc des modulateurs de certains processus pathologiques, comme la progression tumorale et l'angiogenèse. De façon complémentaire, des défauts de synthèse des GAGs sont également

décrits dans des maladies génétiques dans lesquels les enzymes des voies de biosynthèse ou de maturation des chaînes sont déficientes. Des mutations des glycosyltransférases impliquées dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs (dont la  $\beta$ 4GalT7 qui fait l'objet de ce travail de thèse) ont été décrites dans le contexte de certaines formes du Syndrome d'Ehlers-Danlos (SED), une famille de maladies génétiques rares et sévères, dans laquelle la structure et la fonctionnalité des tissus conjonctifs sont profondément altérées. **Dans le cadre de ma thèse**, je me suis intéressé à une glycosyltransférase impliquée dans l'initiation de la biosynthèse des chaînes de GAG, la  $\beta$ 1,4-Galactosyltransférase 7 ( $\beta$ 4GalT7) qui est responsable du transfert du premier résidu galactose de l'amorce tétrasaccharidique qui permet l'ancrage des GAGs à la protéine *core* des PGs. Cette glycosyltransférase présente de plus la particularité de pouvoir utiliser comme substrats accepteurs, des xylosides synthétiques (couplés à des aglycones hydrophobes), ce qui permet d'initier la synthèse des GAGs à partir de ces molécules exogènes. **Dans la première partie de ce travail**, je me suis attaché à réaliser une étude structure-fonction approfondie de la  $\beta$ 4GalT7 de façon à mettre en évidence l'organisation architecturale des sites de fixation des substrats, plus particulièrement celle du substrat accepteur. Pour ce faire, j'ai d'abord réalisé une étude structurale du site actif en m'appuyant sur un modèle moléculaire établi à partir de la structure tridimensionnelle récemment résolue de la  $\beta$ 4GalT7 humaine qui a permis de proposer des résidus d'acides aminés clés dans l'interaction de l'enzyme avec le substrat xylosidique accepteur. Ces positions ont ensuite été systématiquement substituées (de manière conservative ou non) par mutagenèse dirigée afin d'évaluer les rôles et impacts de ces modifications sur l'activité enzymatique *in vitro* et sur la capacité de synthèse des GAGs *in cellulo*. **Sur la base de ces travaux, nous avons, dans un deuxième temps**, proposé des structures xylosidiques modifiées afin de tester leur capacité à moduler l'activité galactosyltransférase de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* et/ou la biosynthèse des GAGs *in cellulo*. En collaboration avec M<sup>me</sup> Chrystel LOPIN-BON de l'ICOA-UMR7311 (Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans) et M<sup>me</sup> Christelle BRETON et M<sup>me</sup> Aline THOMAS de l'équipe de glycobiologie moléculaire du CERMAV-CNRS UPR 5301 (Centre de Recherches sur les MAcromolécules Végétales, Grenoble), nous avons tenté de dessiner des xylosides susceptibles d'inhiber l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* et donc, par extension de s'opposer à la biosynthèse des GAGs *in cellulo*. Ainsi, les différentes molécules synthétisées par voie chimique par l'ICOA, ont été utilisées dans des tests d'inhibition enzymatique *in vitro*. Leur effet biologique a par ailleurs été évalué dans des modèles cellulaires par rapport à leur

capacité à bloquer la biosynthèse des GAGs à partir d'un xyloside exogène ou d'un PG modèle *in cellulo*. Finalement, le potentiel cytotoxique et antiprolifératif du meilleur inhibiteur identifié (un xyloside fluoré en position 4) a été évalué sur les cellules de la lignée CHO-pgsB618 exprimant l'enzyme sauvage ainsi que sur deux lignées cancéreuses humaines, les cellules MDA MB231 (issues d'une tumeur mammaire) et SW1353 (isolées à partir d'une tumeur de chondrosarcome).

Ce manuscrit de thèse débutera par une introduction bibliographique présentant la structure et les fonctions des PGs et des GAGs, ainsi que les enzymes responsables de leur biosynthèse et maturation, en particulier la  $\beta$ 4GalT7 sur laquelle se focalise ce travail de thèse. Une partie consacrée au design et à la caractérisation fonctionnelle de dérivés xylosidiques modifiés (substrats ou inhibiteurs potentiels de la  $\beta$ 4GalT7) sera également développée et sera suivie d'une brève description du syndrome d'Ehlers-Danlos (SED), en particulier de sa forme progéroïde, une maladie génétique rare causant des altérations des tissus conjonctifs, et dans laquelle la  $\beta$ 4GalT7 est mutée.

Le contexte et la problématique de l'étude seront présentés afin d'illustrer l'importance de l'étude de cette enzyme dans un contexte physiopathologique. Après une description détaillée des protocoles expérimentaux dans la section « Matériels et méthodes », les résultats obtenus seront décrits et discutés avant de conclure quant aux perspectives de ce travail, notamment dans le contexte du développement de molécules xylosidiques à visée thérapeutique.

*Introduction*  
*bibliographique*

## Chapitre I : Les protéoglycanes : structure, classification et fonctions biologiques

### I.1- Propriétés structurales et fonctionnelles des protéoglycanes

Un protéoglycane (PG) est une macromolécule présentant une localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituée d'une protéine centrale, nommée protéine porteuse ou encore protéine *core*, sur laquelle sont greffées de façon covalente des chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires appelées chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). La diversité structurale et fonctionnelle des PGs est liée à de nombreux paramètres dont la nature de la protéine *core*, le nombre et la composition des chaînes de GAGs fixées sur le squelette protéique ou encore leur localisation cellulaire.

Cette grande diversité moléculaire explique l'importante capacité d'interaction des PGs avec des protéines matricielles ainsi qu'avec des médiateurs solubles tels que les cytokines et les facteurs de croissance dont ils peuvent ainsi contrôler la biodisponibilité et l'activité biologique (Nikitovic *et al.*, 2014). En liant ces molécules effectrices, les chaînes de GAG des PGs constituent en quelque sorte des « réservoirs » de facteurs de croissance au sein de la matrice extracellulaire (MEC) ou à la surface des cellules. Ces interactions ont souvent lieu au niveau de motifs oligosaccharidiques spécifiques des chaînes de GAG et peuvent avoir des conséquences importantes sur les fonctions biologiques des partenaires d'interaction. Nous pouvons illustrer ce point par l'activité anticoagulante de l'héparine qui est liée à sa capacité à fixer l'antithrombine III (AT-III) par l'intermédiaire d'un motif oligosaccharidique 3-O-sulfaté (Wu *et al.*, 1994 ; Petitou *et al.*, 1988). Cette propriété a par la suite été utilisée pour le développement de nouvelles molécules anticoagulantes capables de la même action, comme un dérivé pentasaccharidique sulfaté qui correspondant au site d'interaction de l'héparine avec l'AT-III (Walenga *et al.*, 2002). Cette molécule bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché depuis 2002 pour la prévention et le traitement des événements thromboemboliques (source : ANSM, Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé, [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)) et représente toujours un « blockbuster » de l'industrie pharmaceutique. De façon complémentaire, les PGs, en particulier les HS situés au niveau de la membrane plasmique, peuvent servir de corécepteurs pour certains facteurs de croissance en formant un complexe ternaire avec le ligand (FGF par exemple) et son récepteur (FGFR) (Xu *et al.*, 2013). Les HS membranaires peuvent donc contribuer à l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation et/ou la migration cellulaires en

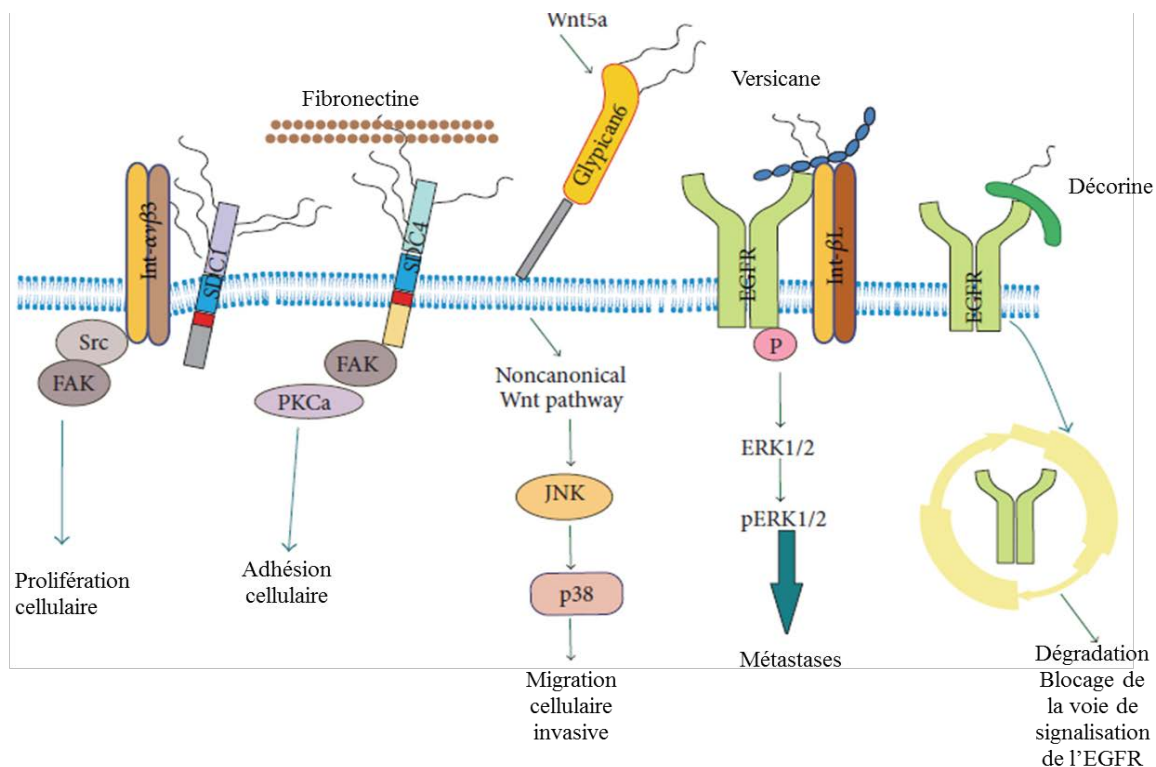


interagissant directement avec les ligands et/ou leurs récepteurs (Mythreya *et al.*, 2009, Figure 1). Les HS membranaires peuvent également être impliqués dans les phénomènes liés à l'adhésion cellulaire, propriété qui est due, entre autres, à la capacité des HS à interagir avec la fibronectine et les intégrines qui participent à la formation des complexes d'adhésion focale au niveau des membranes cellulaires (Chen *et al.*, 2000 ; Yamagata *et al.*, 1999 ; Figure 1). Des interactions entre les syndécanes, des PGs portant des chaînes de HS (HSPG) et le cytosquelette d'actine ou d'autres protéines intracellulaires ont également été décrites dans ce contexte (Couchman *et al.*, 2015 ; Baciou *et al.*, 2000).

Cette grande capacité interactive contribue également au rôle structural des PGs dans la mesure où ils participent à l'assemblage et au maintien de l'architecture tridimensionnelle de la MEC en relation avec le réseau collagénique, ce qui confère aux tissus des propriétés rhéologiques particulières, comme leur capacité à résister aux forces de compression et à la déformation. Dans le cas du cartilage, les PGs de haut poids moléculaire (tels que l'agrécan) participent directement à la résistance du tissu aux forces de compression, ainsi qu'à son hydratation (Knudson *et al.*, 2001). En effet, la forte polarité des PGs (en relation avec la présence des nombreuses charges négatives portées par les groupements carboxylates et sulfates des chaînes de GAG) a pour effet d'attirer de nombreuses molécules d'eau dans la MEC. Ces flux d'eau sont également responsables de la nutrition des tissus dans la mesure où certains éléments nutritifs arrivent au contact des cellules en suivant ces flux d'eau qui circulent dans les MEC.

Ces multiples fonctions peuvent être étudiées et exploitées à des fins thérapeutiques. En effet, la capacité des PGs à contrôler l'activité biologique des cytokines et des facteurs de croissance laisse entrevoir d'intéressantes applications dans le traitement de différentes pathologies comme le cancer ou les maladies dégénératives (Praillet *et al.*, 1996). Mali *et al.*, (1994) ont été parmi les premiers à décrire le rôle « suppresseur de tumeur » du domaine extracellulaire des HS de la famille des syndécanes, domaine qui était capable de bloquer la croissance de plusieurs lignées cellulaires tumorales *in vitro*. Plus récemment, mais dans le même contexte, il a été montré que la perte des HS membranaires (associée à la présence des héparinases qui dégradent spécifiquement les HS) pouvait bloquer les voies de signalisation activées par le FGF, ce qui avait pour conséquence une réduction importante de la prolifération de cellules tumorales de pancréas (Xu *et al.*, 2007).

Il est depuis longtemps établi que les fonctions biologiques des PGs et des GAGs sont étroitement liées à leur structure et à leur capacité d'interaction avec les constituants des MEC (Hardingham *et al.*, 1992). Dans ce contexte, la connaissance de leur métabolisme (c'est-à-dire, leur biosynthèse et leur dégradation) semble primordiale dans un contexte physiopathologique dans la mesure où une dérégulation du métabolisme des GAGs et des PGs peut avoir de multiples et sévères conséquences structurales et fonctionnelles sur le maintien de l'homéostasie tissulaire, ce qui est particulièrement important au niveau d'un tissu comme le cartilage (Vynios *et al.*, 2014). Nous nous focaliserons ici sur la biosynthèse des PGs, qui sera précisée dans le chapitre 2 par une description plus précise de la biosynthèse des GAGs et des systèmes enzymatiques impliqués dans les processus de synthèse et de maturation de ces chaînes polysaccharidiques.



**Figure 1: Schéma illustrant les différentes fonctions des chaînes de glycosaminoglycane (GAG) des protéoglycane (PG).** L'interaction des chaînes de GAG exprimées à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire avec différentes protéines telles que les facteurs de croissance, leurs récepteurs et les molécules d'adhésion conduit à la modulation de multiples fonctions biologiques comme la prolifération, la migration ou encore l'adhésion cellulaire. Dans un contexte pathologique, les PGs, comme le versicane, peuvent également interagir avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et contribuer à la formation de métastases en dérégulant les mécanismes de contrôle de la migration des cellules. *FAK: Focal Adhesion Kinase, Wnt: Wingless integration site, EGF: Epidermal Growth Factor, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases, JNK: c-JUN N-terminal Kinase, PKC:Protéine Kinase C.* D'après Nikitovic *et al.*, 2014.

## **I.2- Classification des protéoglycanes**

Comme nous l'avons vu précédemment, les PGs présentent une grande variabilité structurale et fonctionnelle du fait de la diversité des protéines porteuses mais également de celle des chaînes de GAG qui les constituent. Il existe donc plusieurs systèmes de classification des PGs basés par exemple sur la nature de la protéine *core*, leur composition en unités dissaccharidiques (galacto- ou glucosaminoglycanes), leur taille (PGs de haut ou faible poids moléculaire) ou encore leur localisation cellulaire (membranaires, extra- ou intracellulaires). Arbitrairement, nous choisirons ce dernier type de classification en distinguant quatre grands groupes de PGs : (1) les PGs (extracellulaires) de la MEC, (2) les PGs membranaires, (3) les PGs intracellulaires ou encore (4) les PGs circulants. Nous présenterons plus précisément, dans la partie qui suit, un exemple de chaque type de PGs ainsi que quelques exemples d'autres PGs dont les rôles et les localisations tissulaires et cellulaires sont référencés dans le Tableau 1.

### **I.2.1- Les protéoglycanes extracellulaires**

En raison du grand nombre de membres présents dans cette famille, les PGs extracellulaires peuvent être classés dans différentes sous-familles en fonction de leur taille. Seront tout d'abord distingués ici, les PGs extracellulaires de grande taille, capables de former des complexes macromoléculaires en se liant de façon non covalente avec l'AH comme le fait l'agrécan au niveau du cartilage (Kiani *et al.* 2002, Figure 2, paragraphe I.2.1.1.) ou encore le versicane qui est le PG de haut poids moléculaire le plus répandu dans les MEC des tissus conjonctifs (Sotoodehnejadnematlahi *et al.*, 2013). A côté des PGs de grande taille, sont présents des PGs extracellulaires de petite taille souvent caractérisés par une protéine *core* possédant des séquences répétées riches en leucines (aussi appelés SLRP, *small leucine rich proteoglycans*) comme la décorine, le lumicane ou le biglycane (paragraphe I.2.1.2).

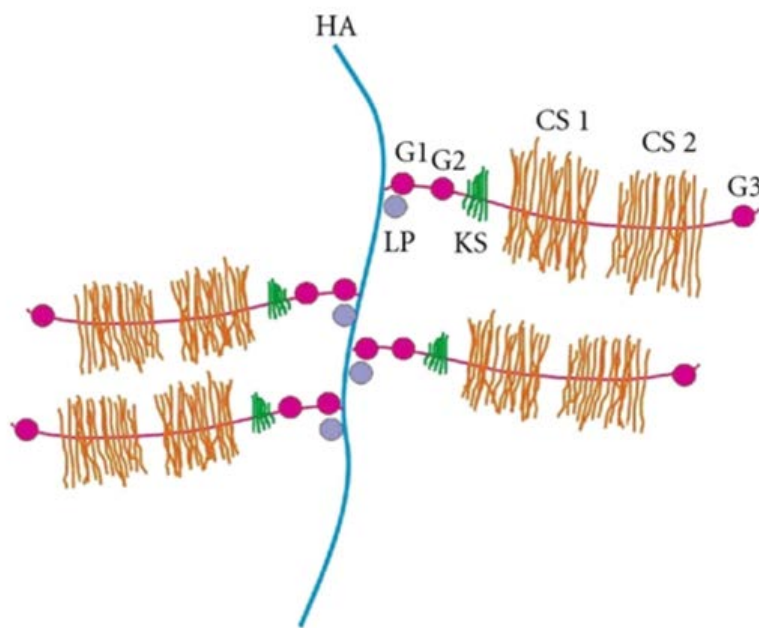
<b>Protéoglycanes</b>	<b>Rôles</b>	<b>Localisation / Tissus</b>	<b>Références</b>
Agrécane (chaînes CS/DS)	Maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du cartilage	Extracellulaire / cartilage	Sivan <i>et al.</i> , 2014
Versicane (chaînes CS)	Implication dans les phénomènes d'adhésion, prolifération, migration et développement.	Extracellulaire / cerveau, sein, tractus gastro intestinal, ovaire, vaisseaux...	Sotoodehnejadnematalahi <i>et al.</i> , 2013
Décorine (chaînes DS)	Implication entre autres dans la fibrillogenèse du collagène et dans la progression du cycle cellulaire (interaction avec des facteurs de croissance, comme l'EGF ou le TGF $\beta$ ).	Extracellulaire / tissus conjonctifs / ubiquitaire	Mohan <i>et al.</i> , 2011
Biglycane (chaînes DS)	Implication dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus (musculaires par exemple), l'ostéogenèse, la neurotransmission, etc...	Extracellulaire / tissus conjonctifs / ubiquitaire	Coulson-Thomas <i>et al.</i> , 2015 ; Nastase <i>et al.</i> , 2012
Luminicane (chaînes KS)	Implication entre autres dans la fibrillogenèse du collagène et participation à la régulation de la prolifération, migration, adhésion...	Extracellulaire / nombreux tissus conjonctifs (os, peau, poumons, rein...)	Nikitovic <i>et al.</i> , 2008
Perlécane (chaînes HS)	Rôle structural au niveau matriciel et au contact des membranes basales des tissus conjonctifs. Rôle fonctionnel plus récemment démontré (interaction et « mise en réserve » de facteurs de croissance dans les matrices)	Extracellulaire / ubiquitaire	Farach-Carson <i>et al.</i> , 2014

Syndécane (chaînes HS)	Transducteurs de signaux, corécepteurs des facteurs de croissance donc capacité à moduler la migration, l'adhésion ou la prolifération cellulaire.	Membranaires / ubiquitaires	Stepp <i>et al.</i> , 2015
Glypicane (chaînes HS)	Transducteurs de signaux, corécepteurs des facteurs de croissance donc capacité à moduler la migration, la différenciation ou la prolifération cellulaire (en particulier, rôle important dans la biogénèse et la morphogénèse osseuses).	Membranaires / ubiquitaires (très étudiés au niveau du tissu osseux)	Dwivedi <i>et al.</i> , 2013
Serglycine (chaînes HP ou CS)	Participation aux phénomènes d'hémostase, régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Favorise le développement de l'inflammation et augmente l'agressivité de certains cancers.	Intracellulaires/ vésicules de stockage des cellules endothéliales et dans les cellules hématopoïétiques	Korpetinou <i>et al.</i> , 2014 Scully <i>et al.</i> , 2012
Bikumine (chaînes DS)	Inhibiteurs de protéases à sérine (trypsine, thrombine)	Circulants / plasma et urines	Pugia <i>et al.</i> , 2007
Endocane (chaînes DS)	Régulation de la biodisponibilité et donc de l'activité biologique de molécules bioactives donc implication dans les phénomènes d'adhésion, prolifération, migration et différenciation cellulaires.	Circulants / plasma	Kali <i>et al.</i> , 2014

**Tableau 1 : Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation cellulaire.**

### I.2.1.1 - Les protéoglycane extracellulaires de grande taille : exemple de l'agrécane

La protéine porteuse de l'agrécane dont le poids moléculaire est d'environ 220 kDa, porte plus de 100 chaînes de CS et une trentaine de chaînes de KS. La majeure partie de la masse de ce PG (90%) est donc constituée de GAGs (Kiani *et al.* 2002). L'agrécane est présent essentiellement au niveau de la MEC du cartilage où il joue un rôle structural et fonctionnel important en participant, entre autres, à la résistance des articulations aux forces de compression (Roughley *et al.*, 2006). La particularité de l'agrécane réside dans sa capacité à former de larges agrégats dans les MEC en se liant de façon non covalente à l'AH. Cette interaction entre l'agrécane et l'AH est stabilisée par une petite glycoprotéine nommée protéine de liaison (LP, *link protein*) qui possède une homologie structurale avec le domaine N-terminal de la protéine porteuse de l'agrécane (Figure 2).



**Figure 2 : Représentation schématique de la structure des agrégats d'agrécane sur l'acide hyaluronique au niveau du cartilage**

HA: acide hyaluronique ; CS1 et CS2 : domaines de fixation (1 et 2) des sulfates de chondroïtine ; KS : domaines de fixation des chaînes de sulfates de kératine ; G1, G2, G3 : domaines globulaires 1, 2 et 3 ; LP : protéine de liaison. D'après Jerosch *et al.*, 2011.

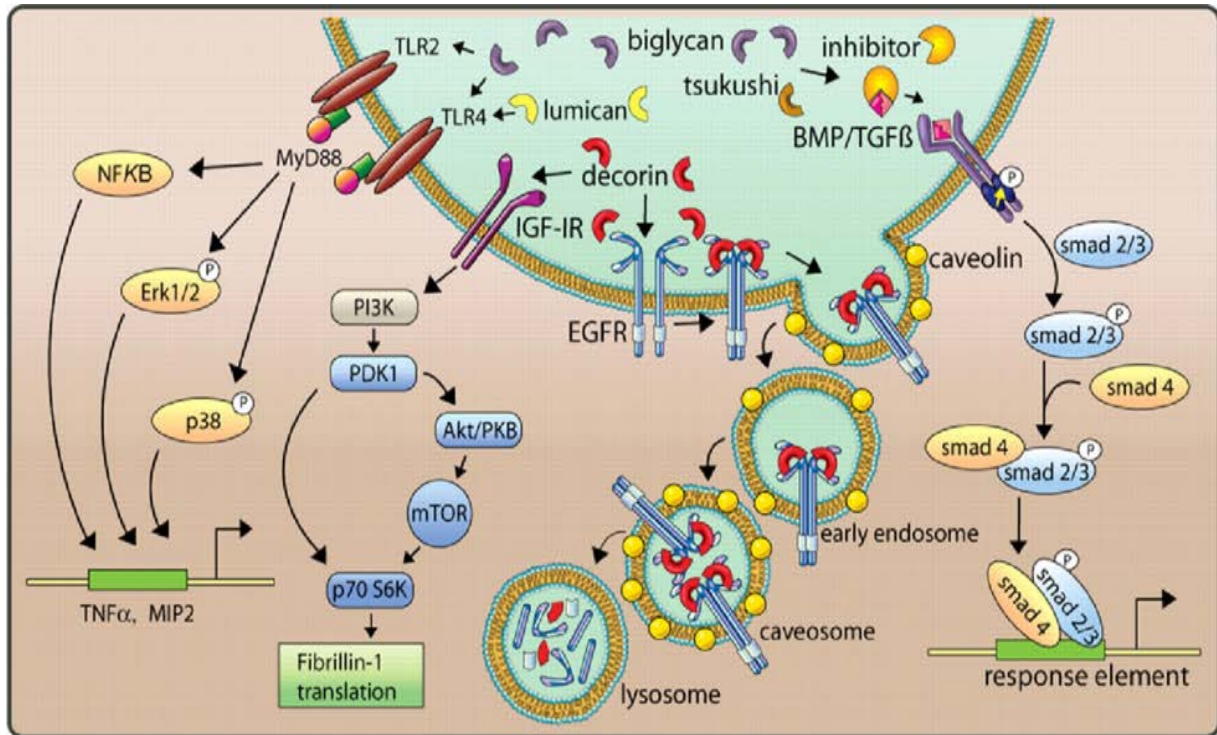
La reconnaissance des motifs d'ancrage pour les chaînes de CS (notés CS1 et CS2) et KS (noté KS) au niveau de la protéine porteuse de l'agrécane par des systèmes enzymatiques spécifiques, permet d'initier la synthèse des GAGs à ce niveau. Les chaînes de KS sont surtout

localisées au niveau d'une courte séquence riche en prolines située dans la partie N-terminale de la protéine alors que les chaînes de CS s'insèrent au niveau d'une zone beaucoup plus étendue jusqu'à la partie C-terminale de la protéine porteuse (Kiani *et al.* 2002, Figure 2). En plus des régions protéiques présentant des glycanations, la protéine *core* de l'agrécane présente trois domaines globulaires, notés G1, G2 (situés du côté N-terminal de la protéine *core*) et G3 (situé du côté du C-terminal de la protéine porteuse) (Figure 2). Le domaine G1 possède plutôt un rôle structural dans la mesure où il interagit avec l'AH et la protéine de liaison pour former un complexe ternaire [agrécane-AH-protéine de liaison] primordial pour la formation des agrégats d'agrécanes sur l'AH dans les MEC (Rodriguez *et al.*, 2006). Le domaine G3 présente, quant à lui, plutôt un rôle fonctionnel, qui est lié à la présence de motifs conservés, comme les domaines protéiques de type *epidermal growth factor (EGF)-like repeat* ou *C-type lectin domain (CLD)*, qui permettent l'interaction de la protéine *core* de l'agrécane avec des molécules matricielles dont l'activité biologique peut ainsi être modulée (Day *et al.*, 2004). Le rôle du domaine globulaire G2 n'est pas clairement établi à l'heure actuelle. Pour résumer, ces domaines fonctionnels et structuraux de la protéine *core* des agrécanes viennent s'ajouter aux motifs d'interaction présents sur les chaînes de GAG, produisant, une importante diversité et complexité structurale et fonctionnelle au système, ce qui est à l'origine des multiples fonctions biologiques connues pour les agrécanes au niveau d'un tissu comme le cartilage par exemple. Récemment, des mutations au niveau du domaine globulaire G3 ont été décrites comme étant à l'origine de dysplasies squelettiques plus ou moins sévères, attestant du rôle fonctionnel déterminant de ce domaine de la protéine *core* de l'agrécane et des interactions qu'il est capable d'établir avec les autres composants matriciels dans le maintien de l'homéostasie tissulaire (Aspberg *et al.*, 2012).

### **I.2.1.2- Les protéoglycans de petite taille : exemple des SLRPs (*small leucine rich proteoglycans*)**

Les SLRPs (*small leucine rich proteoglycans*) sont des PGs de faible poids moléculaire composés d'une protéine *core* d'environ 40 kDa qui possède plusieurs (6 à 10) motifs protéiques répétés riches en résidus leucine nommés LRR (*Leucine Rich Repeats*), constitués par un motif conservé [LxxLxLxxNxL] où L est un résidu leucine, N, un résidu asparagine et x représente n'importe quel acide aminé (Matsushima *et al.* 2000). Ces LRR peuvent contenir des motifs d'ancrage des chaînes de GAG de type CS/DS (comme cela peut être observé pour

la décorine ou le biglycane), ou bien des chaînes de KS comme dans le cas du lumican. Les SLRPs participent à l'organisation structurale de la MEC en contribuant, entre autres, à l'assemblage et à l'orientation des fibres de collagène (Iozzo *et al.*, 1997). D'un point de vue fonctionnel, les SLRPs peuvent également moduler des voies de signalisation cellulaires, du fait de leur interaction avec différents récepteurs tels que les récepteurs enzymatiques possédant une activité tyrosine-kinase (EGFR, IGFR) ou encore les récepteurs de la famille des TLR (*Toll-like receptors*) (Schaefer *et al.*, 2008 - Figure 3).

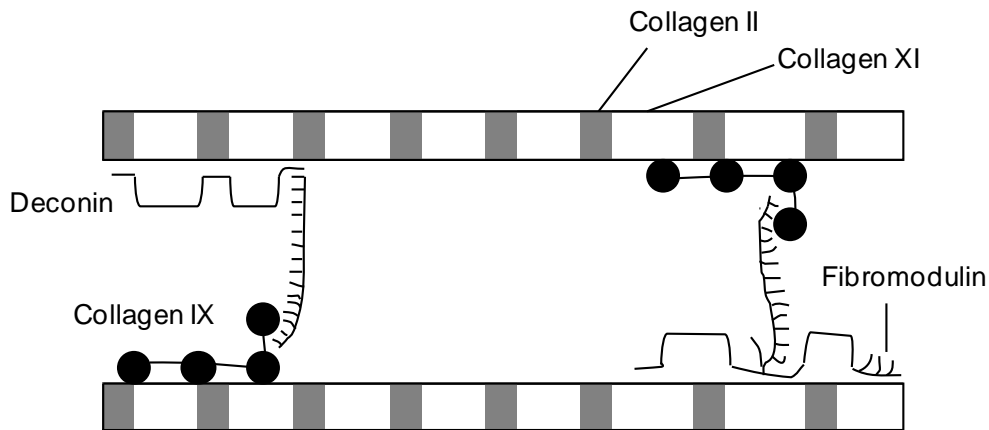


**Figure 3 :** Implication des SLRPs (*small leucine rich proteoglycans*) comme la décorine, le biglycane et le lumican dans les voies de signalisation activées par les récepteurs de l'EGF (EGFR), de l'insuline (IR), les TLR (*toll like receptors*) et les récepteurs du TGFβ. D'après Schaefer *et al.*, 2008

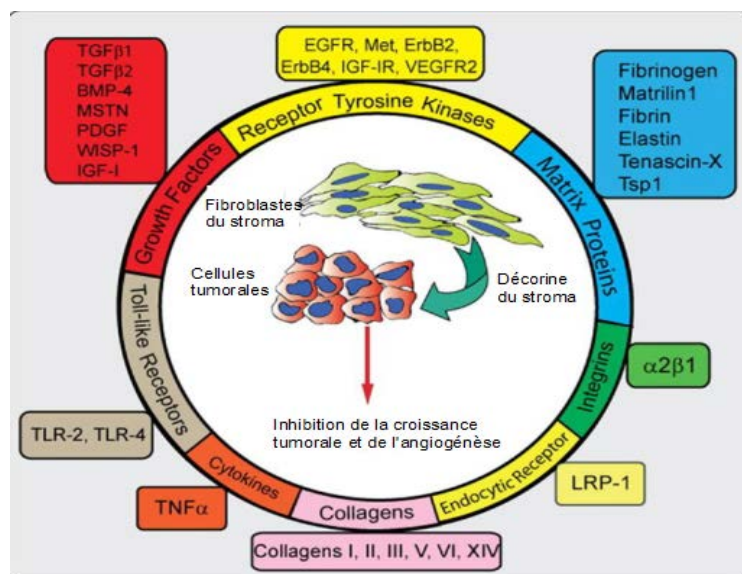
Parmi les SLRPs, nous prendrons l'exemple de la décorine, un PG dont nous avons suivi la glycanation dans un système cellulaire modèle (voir parties « Matériels et Méthodes » et « Résultats »). La décorine est un PG de faible poids moléculaire dont la protéine *core* possède douze LRR et porte une seule chaîne de DS. La décorine a longtemps été considérée comme un PG exclusivement structural de part son intervention majeure dans la fibrillogénèse du collagène (Reed *et al.*, 2002, Figure 4). Cependant, il a été montré qu'elle possédait également un rôle fonctionnel important dans la mesure où elle peut interagir avec un grand nombre de molécules effectrices solubles, membranaires et/ou matricielles, comme des



facteurs de croissance (EGF, VEGF), ainsi qu'avec leurs récepteurs (EGFR, VEGFR) (Figure 5). La décorine peut, dans ce contexte, moduler les voies de signalisation impliquant ces effecteurs et leurs récepteurs en contribuant à l'activation des voies de signalisation conduisant à la transcription de gènes cible impliqués dans les phénomènes de prolifération, différenciation, survie, adhésion ou migration cellulaires (Figure 3).



**Figure 4 : Rôle de la décorine dans l'organisation structurale du réseau collagénique dans les MEC.** La décorine participe à l'organisation du réseau collagénique dans la MEC en interagissant directement avec les molécules de collagène et d'autres composants matriciels comme la fibromoduline. Adapté de Chistiakov *et al.*, 2010



**Figure 5 : Interactome de la décorine.** L'interactome de la décorine comporte une grande diversité de partenaires, comme des facteurs de croissance (PDGF, IGF, TGFβ), des récepteurs portant une activité tyrosine kinase (EGFR, IGF, VEGFR) et des composants de la MEC comme l'élastine et la fibrine, qui interagissent de façon spécifique et avec une grande affinité avec la décorine. D'après Neill *et al.*, 2012.

La décorine peut également avoir un rôle déterminant dans la régulation de processus

pathologiques. A titre d'exemple, nous pouvons citer son rôle bénéfique dans la modulation de la réponse inflammatoire lors des fibroses rénales (Schaefer *et al.*, 2011), ou encore son action « suppresseur de tumeur » liée à sa capacité à neutraliser le TGF $\beta$ , facteur de croissance qui permet l'activation de voies de signalisation conduisant à la prolifération tumorale et favorisant l'angiogénèse (Bi *et al.*, 2013). Dans ce contexte, la décorine possède en effet des propriétés anti-tumorales *in vitro* de part sa capacité à inhiber la prolifération et le potentiel métastatique de certaines cellules tumorales, en bloquant les voies de signalisation initiées par le récepteur ErbB2 (*epidermal growth factor receptor 2*) également nommé *Her 2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) dans le cas du cancer du sein (Reed *et al.*, 2005). Il a également été décrit que la décorine pouvait se lier aux récepteurs du facteur de croissance endothélial (EGFR), provoquant son internalisation et par la suite sa dégradation, ce qui pouvait expliquer l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de l'EGF impliquées dans la prolifération et la migration des cellules tumorales (Nikitovic *et al.*, 2014). Cet effet anti-tumoral a également été observé *in vivo* dans un modèle de tumeurs intracrâniennes chez le rat. La délivrance ciblée du gène de la décorine au niveau de la tumeur dans ce modèle animal a eu pour conséquence une réduction de la progression tumorale associée à une augmentation de la survie des animaux exprimant la décorine au niveau de la tumeur (Biglari *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré qu'une déficience en décorine au niveau de tumeurs hépatiques était à l'origine d'une modification importante du microenvironnement tumoral (Horváth *et al.*, 2014). En effet, l'extinction de l'expression de la décorine entraîne une activation constitutive des récepteurs PDGFR, EGFR et IGF-IR (connus par ailleurs pour interagir avec la décorine, Figure 3, Schaefer *et al.*, 2008), ce qui entraîne une prolifération accrue des cellules tumorales. Dans le même sens, une importante réduction de l'expression des inhibiteurs des CDK (*cyclin dependant kinase*), des protéines régulant négativement la progression du cycle cellulaire, a été observée, ce qui favorise la division des cellules tumorales (Horváth *et al.*, 2014).

Tous ces résultats sont autant de pistes thérapeutiques potentielles ciblant la décorine dans le contexte de stratégies anti-tumorales. Un travail récent montre que l'utilisation de nanoparticules couplées à la décorine, tout comme des adénovirus-associés recombinants contenant dans leur génome la séquence codant la décorine sont capables de réduire le développement d'une péritonite dans un modèle de fibrose péritonéale induite chez le rat (Chaudhary *et al.*, 2014). Les PGs (comme dans cet exemple, la décorine) peuvent donc

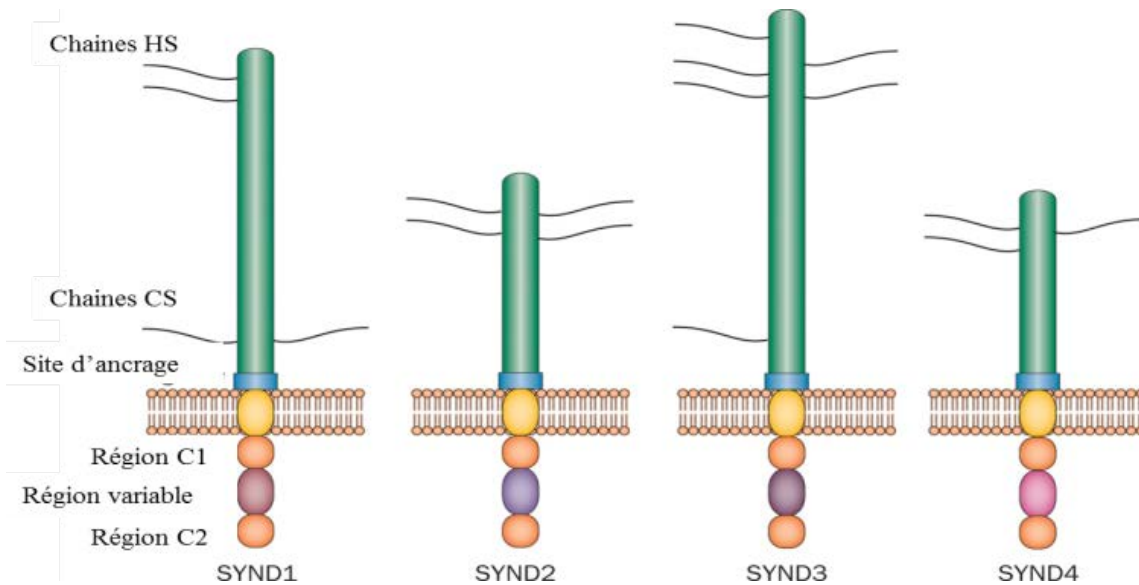
représenter des cibles pharmacologiques importantes à considérer dans le cadre du développement de thérapies anti-inflammatoires ou anti-tumorales par exemple.

### **I.2.2- Les protéoglycanes membranaires : exemple des syndécanes**

De par leur positionnement stratégique au niveau de la membrane plasmique, à l'interface cellule-matrice, les PGs membranaires peuvent avoir un rôle de transducteurs de signaux, de corécepteurs des facteurs de croissance, et peuvent donc moduler différents processus physiopathologiques comme la migration, l'adhésion ou la prolifération cellulaire (Stepp *et al.*, 2015). Nous prendrons ici l'exemple des syndécanes dont la structure et les fonctions biologiques seront développées dans les paragraphes suivants.

Toutes les protéines *core* des PGs membranaires sont constituées de trois régions aux fonctions distinctes (Figure 6): les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire.

- Le domaine extracellulaire, présentant la plus grande variabilité structurale et fonctionnelle, et contenant plusieurs sites de glycanation (pour la fixation des chaînes de HS majoritairement et CS dans une moindre mesure). Les chaînes de GAG fixées à ce niveau (surtout les HS diversement sulfatés) peuvent interagir avec des molécules solubles effectrices comme les facteurs de croissance par exemple. Ce domaine contient, à proximité de la membrane, un site de clivage protéolytique permettant au PG de se retrouver sous une forme soluble suite à l'action des protéases matricielles.
- Le domaine transmembranaire, constitué en majorité d'acides aminés hydrophobes, permet l'ancrage à la membrane. Ce domaine possède par ailleurs un site de dimérisation, permettant aux syndécanes de se dimériser pour former des homo- et/ou hétérodimères. Cette particularité les rapprochent des récepteurs aux facteurs de croissance dont ils peuvent moduler l'activation en interagissant avec leurs ligands, mais surtout leur permet de créer un large réseau d'interaction avec d'autres protéines comme les intégrines qui sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Dews *et al.*, 2007).
- Le (court) domaine cytoplasmique, composé de trois motifs (une région variable et deux régions conservées, notées C1 et C2), est capable de développer des interactions avec des protéines intracellulaires (comme des kinases) dont ils peuvent moduler l'activité cellulaire et les voies de signalisation contrôlées par ces protéines effectrices.

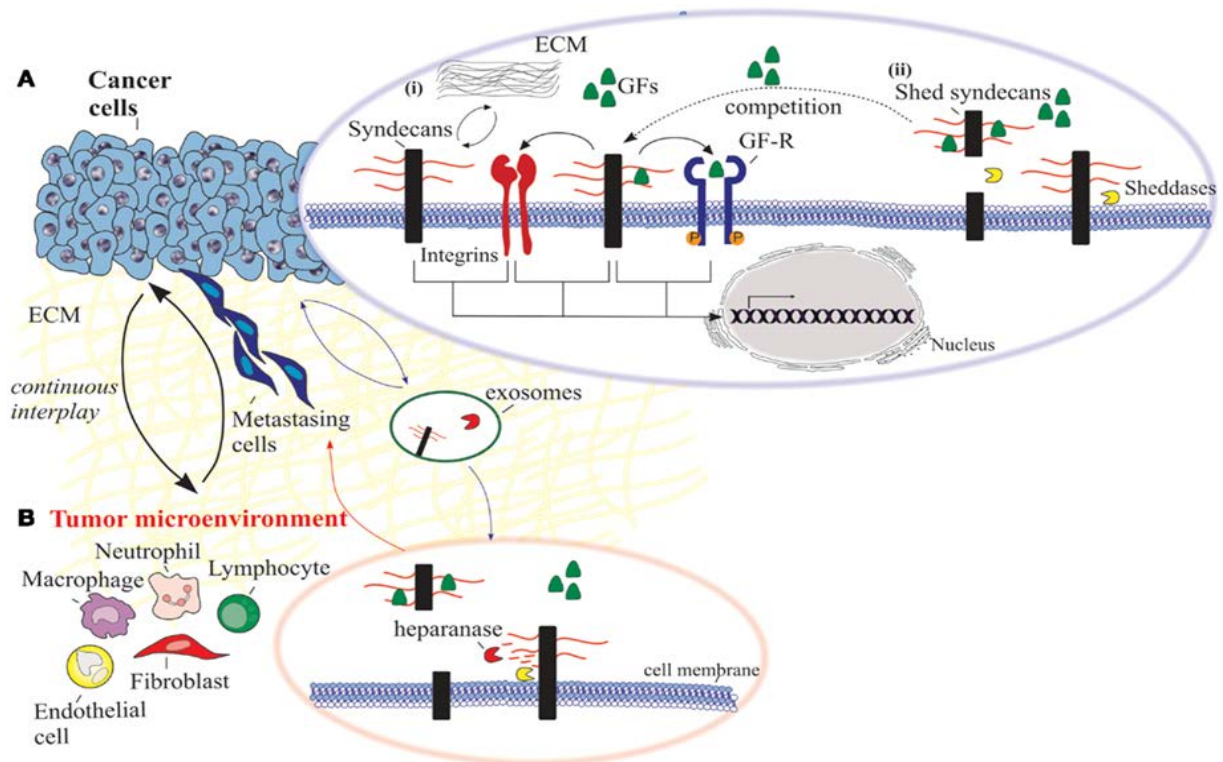


**Figure 6 : Représentation schématique des différents types de syndécanes (SYND1, 2, 3 et 4).** Le domaine extracellulaire (en vert) porte les chaînes de CS et/ou HS. La région péri-membranaire (en bleu) contient un site de clivage reconnu par les protéases matricielles et conduisant à la libération de la forme soluble du PG . Le domaine transmembranaire (en jaune) permet l’ancrage à la membrane plasmique et contient le site de dimérisation à l’origine de la formation des homodimères ou hétérodimères de syndécanes dans les membranes. Le domaine intracellulaire est composé d’une région variable flanquée par deux régions conservées (C1 et C2). Ce domaine peut interagir avec des protéines intracellulaires (comme des kinases) et induire l’activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaires.  
 Abréviations: CS : chondroïtine sulfate; HS : Héparane sulfate; SYND : syndécane. D’après Pap *et al.*, 2013.

Du fait de leur localisation membranaire, du vaste réseau d’interactions qu’ils sont capables de développer avec de nombreux effecteurs protéiques (facteurs de croissance, intégrines...), les PGs membranaires ont été associés (positivement ou négativement) au développement de processus pathologiques comme l’inflammation (Patterson *et al.*, 2012), les maladies neurodégénératives (Bruinsma *et al.*, 2010) ou encore l’angiogénèse et le processus tumoral (De Rossi *et al.*, 2014 - Figure 7).

Plus généralement, les PGs membranaires sont capables de moduler ou déréguler l’activation des voies de signalisation impliquées dans ces phénomènes, ce qui entraîne une modification de l’environnement cellulaire à l’origine de l’apparition d’un phénotype cancéreux en favorisant la prolifération et la migration des cellules.

Des exemples plus détaillés seront développés ci-dessous au niveau de la partie qui décrit les fonctions des différents membres de la famille des syndécanes.



**Figure 7 : Vue d'ensemble de l'implication des syndécans dans le processus tumoral.**

A : Dans les cellules cancéreuses, les syndécans interagissent avec diverses macromolécules de la MEC qui proviennent, soit de cellules stromales, soit des cellules tumorales. Ces interactions induisent la perturbation des propriétés fonctionnelles médiées en particulier par les intégrines, telles que la prolifération cellulaire, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire. D'autre part, les syndécans interagissent avec les facteurs de croissance (GFs) par l'intermédiaire de leurs chaînes de HS et agissent donc comme co-récepteurs pour les récepteurs des facteurs de croissance (GF-R). Dans les deux cas, les intégrines peuvent agir de façon concertée avec ces complexes et par conséquent moduler différentes voies de signalisation. La libération de la forme soluble du syndécane est un processus qui implique le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire (ectodomaine, shed syndécans) à proximité de la membrane plasmique par des protéases matricielles (sheddases). L'excrétion des syndécans contribue à la modification du microenvironnement de la tumeur et favorise la progression tumorale et l'invasion cellulaire par les métastases.

B : Dans le microenvironnement tumoral, les héparanases jouent un rôle important vis-à-vis des syndécans en dégradant les chaînes de HS de la protéine core et favorisent de ce fait l'action des protéases (qui vont cliver le domaine extracellulaire des syndécans). Cette action favorise la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formations des métastases. D'après Barbouri *et al.*, 2014.

La famille des syndécanes se compose de quatre PGs, les syndécanes 1, 2, 3 et 4. Bien que tous les syndécanes possèdent des fonctions biologiques communes, ils sont toutefois associés de façon plus spécifique à certaines voies de signalisation et sont de ce fait exprimés de façon différente au cours du développement puis à la surface des cellules.

Le syndécane 1, le PG membranaire le plus étudié à l'heure actuelle, est majoritairement exprimé par les cellules épithéliales (Inki *et al.*, 1996) et impliqué dans divers processus biologiques comme l'adhésion cellulaire, la migration, le développement ou encore les phénomènes de réparation tissulaire, en raison du large réseau d'interactions qu'il est capable de développer au contact de la membrane (Stepp *et al.*, 2015). L'expression basale du syndécane 1 est indispensable au maintien de l'état différencié des cellules épithéliales et la réduction de son expression membranaire (à la faveur de sa forme soluble) est de mauvais pronostic pour la fonctionnalité tissulaire, ce qui peut contribuer à une différenciation cellulaire et l'apparition d'un phénotype cancéreux. (Szatmári *et al.*, 2015). L'analyse de l'expression de la forme soluble du syndécane 1 a par ailleurs été proposée comme marqueur pronostique de la malignité de certains types de tumeurs (Mundt *et al.*, 2014 ; Lim *et al.*, 2014). En raison de son rôle fonctionnel déterminant dans l'état de différenciation des cellules et de leur adhésion, le syndécane 1 peut donc être considéré comme une cible pharmacologique potentielle dans le cadre de développement de stratégies anti-tumorales (Barbouri *et al.*, 2014).

Le syndécane 2 (ou fibroglycane) a été récemment décrit comme un modulateur du microenvironnement osseux avec une expression fortement augmentée au cours de la différenciation ostéoblastique. Le syndécane 2 possède par ailleurs d'autres fonctions cellulaires dans la mesure où il peut servir de corécepteur pour les facteurs de croissance de la famille des FGF, favorisant ainsi l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'adhésion cellulaires (Mansouri *et al.*, 2015). Il a également été montré que sa surexpression dans des cellules d'ostéosarcome entraînait l'apoptose des cellules tumorales et que sa présence augmentait la sensibilité des cellules aux traitements utilisés en chimiothérapie, ce qui fait de ce syndécane une bonne cible potentielle pour le développement de stratégies thérapeutiques dans le cas du traitement des tumeurs osseuses (Orosco *et al.*, 2007).

Le syndécane 3 (ou N-syndécane) est un PG membranaire principalement exprimé au niveau du système nerveux central et périphérique. Comme pour les autres membres de la famille des

syndécane, les chaînes de HS portées par la protéine *core* du syndécane 3 peuvent interagir avec des facteurs de croissance comme le FGF2 (*fibroblast growth factor-2*), ce qui explique leur implication dans la régulation des voies de signalisation dépendante de ce facteur, conduisant à la prolifération, la migration ou l'adhésion cellulaire, (Carey *et al.*, 1996). Dans ce contexte, il a été montré que le syndécane 3 est exprimé de façon plus importante dans les chondrocytes au moment de leur prolifération, ce qui s'explique par leur capacité à interagir avec le FGF2 et l'IGF1 (*insulin-like growth factor-1*), des agents mitogènes qui ont été spécifiquement décrits pour induire la prolifération des chondrocytes. Cet effet pro-prolifératif associé au syndécane 3 est par ailleurs complètement neutralisé par des anticorps anti-syndécane 3, attestant de la spécificité d'action du syndécane dans ce phénomène (Kirsch *et al.*, 2002).

Le syndécane 4 (ou ryudocane) est exprimé de façon ubiquitaire et possède les mêmes propriétés régulatrices que les autres membres de la famille des syndécane, en particulier grâce à son rôle de corécepteur pour le FGFR1 et FGFR4 et à son implication dans l'activation de voies de signalisation intracellulaire impliquant les MAP kinases (*mitogen activated protein kinase*) (Elfenbein *et al.*, 2013). Le syndécane 4 peut également interagir avec d'autres protéines transmembranaires telles que les intégrines et ainsi moduler les processus d'adhésion cellulaire. Son rôle direct ou indirect dans le processus tumoral a également été décrit et sa surexpression dans les cellules tumorales peut être associée à un mauvais pronostic, comme c'est le cas dans les tumeurs testiculaires dont il favorise la prolifération (Labropoulou *et al.*, 2013). A l'inverse, sa surexpression peut avoir un effet bénéfique sur l'inflammation pulmonaire chez la souris. En effet, le syndécane 4 injecté aux animaux entraîne une forte augmentation du nombre de cellules souches progénitrices bronchiques (qui seront à l'origine du renouvellement de l'épithélium pulmonaire), ce qui limite, voire réduit, localement l'inflammation. Cet effet est renforcé par le fait que le syndécane 4 est capable d'activer en parallèle des voies de signalisation responsables de la production de molécules antioxydantes au niveau des cellules pulmonaires (Santoso *et al.*, 2015).

### **I.2.3- Les protéoglycanes intracellulaires : exemple de la serglycine**

La serglycine un petit PG dont la protéine *core* présente une masse moléculaire comprise entre 17 et 20 kDa, sur laquelle sont fixées des chaînes de GAG de type HP ou CS (Kolset *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que la serglycine est le seul PG connu à l'heure actuelle pour porter des chaînes d'héparine. La serglycine est présente, entre autres, dans les cellules endothéliales et dans les cellules hématopoïétiques, majoritairement dans les granules de sécrétion et les vésicules de stockage des cellules du système immunitaire tels que les mastocytes, les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules NK (*Natural Killer*), les neutrophiles et les plaquettes. La serglycine est un PG multifonctionnel qui est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques comme l'hémostase, la croissance cellulaire, l'apoptose mais également dans la reproduction (Scully *et al.*, 2012). Le rôle de la serglycine le plus décrit concerne les processus de thrombose et d'agrégation plaquettaire : dans ce contexte, la présence de la serglycine semble indispensable à la fonctionnalité des plaquettes et à la formation du thrombus. Pejler *et al.*, (2009) et Woulfe *et al.*, (2008) ont montré que la déficience génétique en serglycine chez la souris induit une mauvaise agrégation plaquettaire qui pourrait être due à une perturbation des phénomènes sécrétoires à partir des granules et vésicules de stockage de médiateurs impliqués dans l'activation des plaquettes et dans la formation du thrombus.

Parallèlement, la serglycine pouvait être impliquée dans différents processus pathologiques comme le cancer ou l'inflammation. Dans ce contexte, il a été démontré que la serglycine serait fortement exprimée par certaines cellules tumorales et qu'elle favoriserait leur phénotype agressif en contribuant en particulier à la formation et à la dissémination des métastases (Korpetinou *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2011). Il a également été décrit que la serglycine joue un rôle important dans les réactions inflammatoires en favorisant la rétention des facteurs pro-inflammatoires (cytokines, protéases) dans les granules de sécrétion et les vésicules de stockage des cellules du système immunitaire. Ainsi, suite à une infection par exemple, la serglycine peut perturber la libération et le transport des médiateurs inflammatoires, les empêchant d'interagir avec leurs cibles extracellulaires et favorisant l'installation du phénomène inflammatoire (Kolset *et al.*, 2008).



#### **I.2.4. Les protéoglycanes circulants : exemple de l'endocane**

L'endocane, également connu sous le nom d'ESM-1 (*Endothelial cell-Specific Molecule 1*), est un PG soluble d'environ 50kDa constitué d'une protéine *core* portant une unique chaîne de DS. Exprimé au niveau de l'endothélium vasculaire, l'endocane a également été retrouvé sous forme circulante dans le plasma de sujets sains. A ce niveau, l'endocane est capable de contrôler la biodisponibilité et donc l'activité biologique de certains médiateurs solubles (comme les cytokines et les facteurs de croissance) en interagissant avec eux et en les « piégeant » dans le plasma. De ce fait, les phénomènes biologiques contrôlés par ces médiateurs solubles, comme l'adhésion, la migration ou encore la prolifération cellulaires sont perturbés par la présence de ce PG circulant (Kali *et al.*, 2014).

Dans un contexte pathologique, il a été montré qu'une augmentation de l'expression plasmatique de l'endocane témoigne d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales qui le produisent, ce qui conduit à terme au développement d'une inflammation (Cox *et al.*, 2015). Balta *et al.*, (2015) ont très récemment utilisé l'endocane comme un nouveau marqueur de l'inflammation systémique, à côté des autres médiateurs pro inflammatoires déjà connus (comme l'IL1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$ ) dans le contexte des maladies cardiovasculaires. L'intérêt clinique du ciblage de cette molécule dans ce contexte reste encore à étudier, mais peut s'avérer pertinent dans le cadre du développement de nouveaux traitements anti-inflammatoires (Lee *et al.*, 2014).

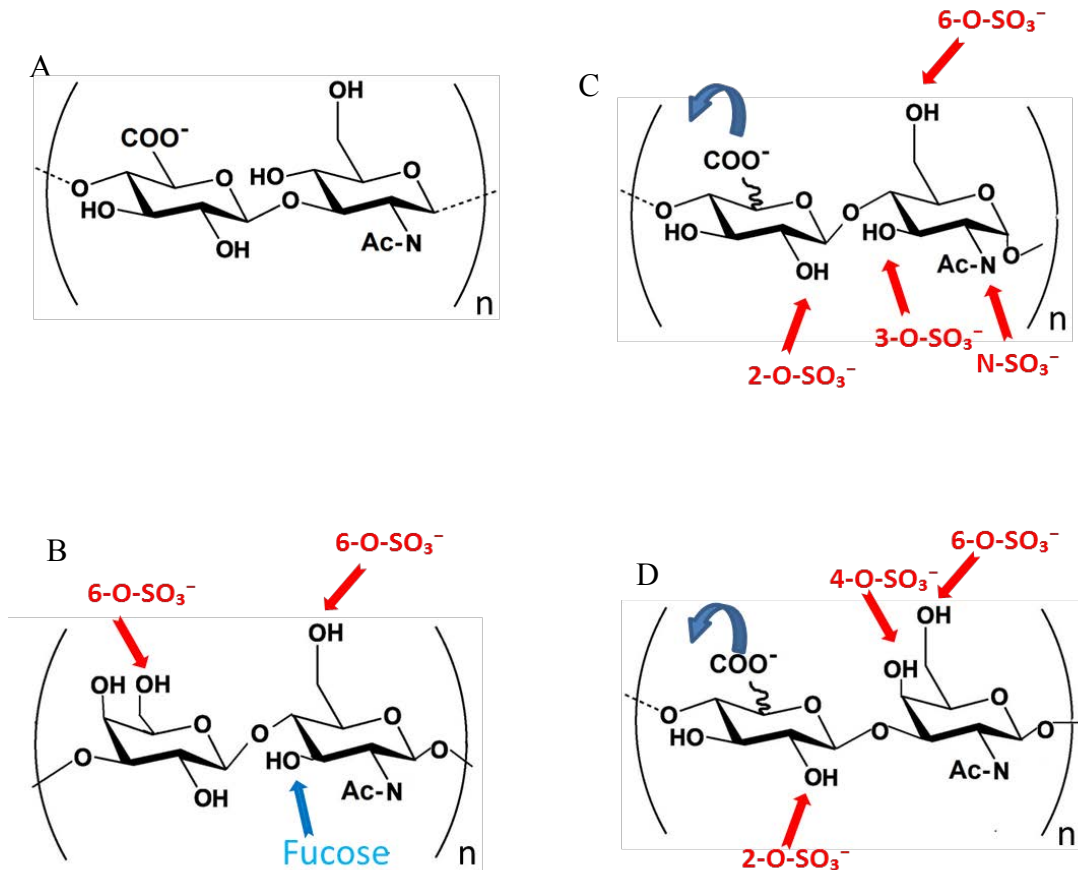
L'importance du rôle de l'endocane dans le processus tumoral a également été étudiée. Une augmentation de son expression a par exemple été directement associée à une progression tumorale accrue dans des modèles de xénogreffes chez la souris (Abid *et al.*, 2006). Son expression augmentée dans certaines tumeurs, comme les tumeurs pulmonaires (Grigoriu *et al.*, 2006), hépatiques (Ozaki *et al.*, 2014) ou rénales (Leroy *et al.*, 2010), vient de plus attester de son rôle pro tumoral dans ce contexte. Il apparait de plus que la présence de l'endocane au niveau plasmatique soit considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans certains types de cancers, faisant de l'endocane un biomarqueur plasmatique potentiel pour évaluer l'agressivité de la tumeur chez les patients (Yang *et al.*, 2015). Ces récentes études suggèrent finalement que l'endocane pourrait constituer une cible pharmacologique potentielle dans le cadre de futurs développements de nouvelles stratégies anticancéreuses, comme dans le cadre des cancers gastriques par exemple (Zhao *et al.*, 2014).

## Chapitre II : Les glycosaminoglycanes

### II.1- Généralités sur les chaînes de GAG

Les GAGs sont des chaînes polysaccharidiques linéaires. Ils sont généralement constitués de la répétition de motifs disaccharidiques incluant un résidu d'acide hexuronique (D-glucuronique ou L-iduronique) et une hexosamine (D-glucosamine ou D-galactosamine) reliés entre eux par des liaisons osidiques de type  $\beta$ 1,3 et/ou  $\beta$ 1,4. En fonction de la structure de l'unité disaccharidique, les GAGs ont été classés en 4 familles : (1) l'acide hyaluronique, seul GAG non lié à une protéine porteuse, (2) les sulfates de chondroïtine /sulfates de dermatane, (3) les sulfates d'héparane et l'héparine, (4) les sulfates de kératane. Les GAGs sont généralement liés de façon covalente à un résidu sérine d'une protéine *core* d'un PG *via* une région tétrasaccharidique commune, constituée par un xylose (Xyl), deux galactoses (Gal) et un acide glucuronique (GlcA). L'ajout du cinquième sucre amino-acétylé, décidera de la nature de la chaîne de GAG. Ainsi, si le sucre est la N-acétylglucosamine (GlcNAc), l'élongation des chaînes s'oriente vers la formation de HS/Hp, au contraire, si c'est une N-acétylgalactosamine (GalNAc), nous retrouverons des chaînes de CS/DS. Dans tous ces cas, les sucres aminés alternent avec un acide uronique suite à un processus de polymérisation enzymatique catalysé par plusieurs familles de glycosyltransférases permettant la formation de longues chaînes de GAGs linéaires, constituées d'unités disaccharidiques qui peuvent subir d'importantes modifications (épimérisation et sulfatations principalement) (Figure 8).

Les chaînes de GAG possèdent un nombre variable de groupements sulfates et/ou carboxyles leur conférant une charge globale négative. Cette charge joue un rôle important dans la plupart des activités des PGs. Le degré de sulfatation varie selon le GAG considéré et contribue à la diversité de fonctions et de propriétés de ces molécules. Cette variabilité de sulfatation s'étend également au sein d'une même famille de GAG où divers degrés de sulfatation peuvent être observés selon le stade de développement, le tissu et l'état physiopathologique du tissu considéré.

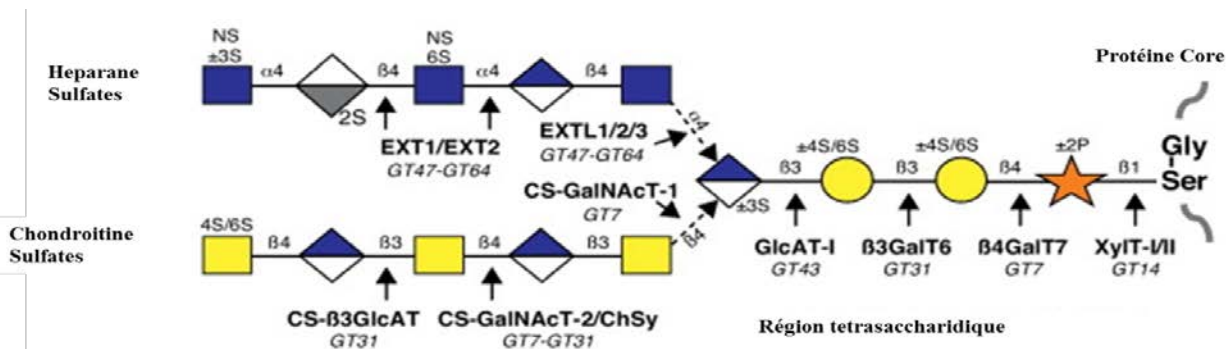


**Figure 8 : Motifs disaccharidiques des différents GAGs et leurs modifications.** **A :** L'AH est composé de motifs disaccharidiques reliés entre eux par des liaisons type  $\beta$ 1-4. Chaque unité disaccharidique est constituée d'un acide glucuronique relié à une N-acétylglucosamine par une liaison  $\beta$ 1-3. **B :** Les KS sont composés de disaccharides reliés entre eux par des liaisons  $\beta$ 1-3. Ces disaccharides sont composés d'un galactose et d'une N-acétylglucosamine liés par une liaison  $\beta$ 1-4. Ces chaînes peuvent étre 6-sulfatées sur les deux oses, et un fucose peut étre lié en C3 de la N-acétylglucosamine. **C :** L'Hp et les HS sont composés d'unités disaccharidiques reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$ 1-4. Ces unités sont constituées d'un acide hexuronique et d'une N-acétylglucosamine liés par des liaisons  $\beta$ 1-4. Ces chaînes peuvent subir des 3, 6 ou N-sulfatations sur la N-acétylglucosamine, ainsi qu'une 2-O-sulfatation sur l'acide hexuronique. Une épimérisation est possible en C5 de l'acide glucuronique qui se transforme dans ce cas en acide iduronique. **D :** les CS sont composés de disaccharides reliés entre eux par des liaisons  $\beta$ 1-4. Les unités disaccharidiques sont constituées d'un acide glucuronique et d'une N-acétylgalactosamine liés par une liaison  $\beta$ 1-3. Ces chaînes peuvent subir une 2-O-sulfatation sur l'acide hexuronique ainsi que des 4- et 6-sulfatations sur la N-acétylgalactosamine. Si l'acide glucuronique subit une épimérisation sur le carbone 5, ces chaînes de CS seront considérées comme étant des chaînes de DS.

## II. 2 - Biosynthèse et maturation des chaînes de GAG

### II. 2.1 - Biosynthèse de la séquence tétrasaccharidique commune aux principales chaînes de GAG

La biosynthèse des chaînes de GAG des PGs démarre généralement par celle du tétrasaccharidique  $\text{GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl}\beta\text{1-}$  à partir du transfert d'un xylose sur le résidu sérine d'une protéine porteuse (Zhang *et al.*, 1994). Cette séquence permet ensuite l'initiation de la polymérisation des chaînes de GAG par l'addition alternée de GlcNAc ou GalNAc et d'un acide hexuronique (Sarkar *et al.*, 1995). La biosynthèse de cette séquence tétrasaccharidique est séquentielle, puisque le transfert des quatre monosaccharides nécessite l'action successive de quatre glycosyltransférases. La première réaction de transfert implique celui du résidu xylose sur le résidu sérine de la protéine porteuse par les xylosyltransférases I / II (XylT-I/II) à partir d'un UDP-Xyl dans le réticulum endoplasmique et le cis-Golgi (Götting *et al.*, 2000). Le transfert des deux résidus galactose suivants est réalisé par la  $\beta\text{1,4-galactosyltransférase 7}$  ( $\beta\text{4GalT7}$ ) (Okajima *et al.*, 1999) et la  $\beta\text{1,3-galactosyltransférase 6}$  ( $\beta\text{3GalT6}$ ) (Bai *et al.*, 2001) successivement, à partir d'UDP-Gal, dans les compartiments cis- et medium- du Golgi. Puis, la glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I) termine la biosynthèse de cette séquence tétrasaccharidique en transférant un résidu d'acide glucuronique dans les compartiments medium et trans-Golgi (Wei *et al.*, 1999 ; Kitagawa *et al.*, 1998). Le schéma de la biosynthèse de cette séquence tétrasaccharidique est présenté en Figure 9.



**Figure 9 : Représentation schématique de la voie principale de synthèse des glycosaminoglycane.** Les GAGs sont liés de façon covalente au résidu sérine de la protéine porteuse du PG par la séquence tétrasaccharidique  $\text{GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl}\beta\text{1-}$ . La biosynthèse de cette amorce est initiée par le transfert d'un xylose sur un résidu sérine de la protéine porteuse par les xylosyltransférases I et II (XylT-I /II), suivi par le transfert de deux résidus galactose catalysé par les galactosyltransférases I ( $\beta\text{4GalT7}$ ) et II ( $\beta\text{3GalT6}$ ) respectivement et enfin, par le transfert d'un résidu d'acide glucuronique par la glucuronosyltransférase I (GlcAT-I). D'après Breton 2012 *et al.*, 2012.

A ce niveau, au moins deux modifications biochimiques permettent de réguler à la fois la quantité de chaînes de GAG produite, l'élongation des chaînes ainsi que l'orientation de la synthèse vers l'une ou l'autre des deux catégories de GAG.

La première modification consiste en la 2-O-phosphorylation du xylose. Les premières observations de la phosphorylation du xylose au sein des GAGs ont été faites il y a déjà plus de trois décennies (Oegema *et al.*, 1984 ; Fransson *et al.*, 1985). Cette 2-O-phosphorylation se déroule dans l'appareil de Golgi, et l'enzyme responsable de cette 2-O-phosphorylation récemment clonée est la FAM20B (Koike *et al.*, 2009). Cette dernière est nommée ainsi puisqu'elle appartient à la famille de protéine kinases sécrétées. Le rôle et l'impact de l'activité de la FAM20B du point de vue biologique ou physiologique ne sont pas encore complètement connus. Il semble en tout cas que son activité enzymatique soit associée à une augmentation de la quantité de chaînes de GAG produites (HS et CS confondus), comme cela été montré dans les cellules HeLa par exemple (Koike *et al.*, 2009). Cet effet activateur de la 2-O-phosphorylation du résidu xylose au sein du tétrasaccharide pourrait en partie être dû à la meilleure activité observée de la GlcAT-1 et de la  $\beta$ 3GalT6 vis-à-vis des substrats 2-O-phosphorylés par rapport à ceux non phosphorylés (Tone *et al.*, 2008). Par contre, les substrats 2-O-phosphorylés sont de moins bons substrats de la  $\beta$ 4GalT7 (Gulberti *et al.*, 2005) suggérant que cette modification permettrait de réguler de manière fine la formation de l'amorce tétrasaccharidique et par conséquent la polymérisation ultérieure des chaînes de GAGs. Il est également à noter que ce phénomène biochimique est transitoire puisqu'un mécanisme de déphosphorylation à l'approche de l'étape d'élongation a été démontré, mais les phosphatases impliquées n'ont pas encore été découvertes (Moses *et al.*, 1997 et 1999).

Le deuxième type de modification remarquable consiste en la sulfatation des positions C4 et/ou C6 des résidus galactoses. Il semble que ces modifications sont critiques dans l'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAG vers celle des CS. En effet, la présence de groupements sulfates sur ces positions semblent augmenter significativement l'activité catalytique de la N-acétylgalactosaminyltransférase I (Gulberti *et al.*, 2012). Les sulfotransférases impliquées dans ce processus régulateur n'ont pas encore toutes été découvertes, cependant, des études suggèrent que la CS-6-sulfotransférase 1 pourrait être un bon candidat (Kitagawa *et al.*, 2008).

Il est donc important de constater que dès la biosynthèse de la séquence tétrasaccharidique commune aux principales catégories de chaînes de GAG, des modifications biochimiques

interviennent dans le cadre de la régulation fine de la biosynthèse de ces chaînes en termes de quantité, de longueur et d'orientation des voies de synthèse (CS ou HS).

## **II. 2.2 - Élongation et maturation des chaînes de Sulfates de Chondroïtine et de Dermatanane**

### **II. 2.2.1 – Élongation des chaînes de Sulfates de Chondroïtine/Dermatanane**

L'orientation de la synthèse des chaînes de GAG vers les Hp/HS ou vers les CS/DS s'effectue dès le transfert du cinquième résidu sur l'amorce tétrasaccharidique. Ainsi, la synthèse des CS/DS commence avec le transfert d'un résidu GalNAc à partir de l'UDP-GalNAc grâce une CS-N-acétylgalactosaminyltransférase I (Sugahara *et al.*, 2001) et se poursuit par l'action d'une CS-glucuronyltransférase II qui transfère un résidu d'acide glucuronique sur la chaîne en cours de synthèse (Gotoh *et al.*, 2002). Puis, ce serait l'activité alternative d'une CS-N-acétylgalactosaminyltransférase II (Uyama *et al.*, 2003) et de la CS-glucuronyltransférase II qui permettrait l'élongation de la chaîne de CS. Il est à noter que d'autres enzymes, nommées CS-synthase 2 et CS-synthase 3 (Yada *et al.*, 2003), ont été suggérées contribuer à la polymérisation des chaînes de CS. En effet, ces enzymes ont été identifiées comme présentant des activités glucuronyltransférase et N-acétylgalactosaminyltransférase. Toutefois, il est communément admis aujourd'hui que ces enzymes, seules, ne suffisent pas à assurer la polymérisation de la chaîne de sulfate de chondroïtine. Il est suggéré qu'elles agissent sous forme de complexes enzymatiques les impliquant et incluant probablement un facteur de polymérisation CHPF (la CS-synthase 2) (Izumikawa *et al.*, 2008).

### **II. 2.2.2 – Maturation des chaînes de Sulfates de Chondroïtine/Dermatanane**

Au cours de l'étape d'élongation, les chaînes de CS subissent deux principales modifications chimiques leur permettant de se différencier et d'acquérir leur fonctionnalité biologique définitive.

La première modification majeure co-/post-polymérisation des chaînes de CS est l'épimérisation. Cette étape consiste en l'épimérisation des résidus d'acide glucuronique en résidus d'acide iduronique grâce à l'action de deux enzymes : les acide glucuronique C5-épimérasés 1 et 2 également nommés DS-épimérasés 1 et 2 (Maccarana *et al.*, 2006 ; Pacheco *et al.*, 2008) (Figure 10). Cette modification est majeure dans la mesure où elle

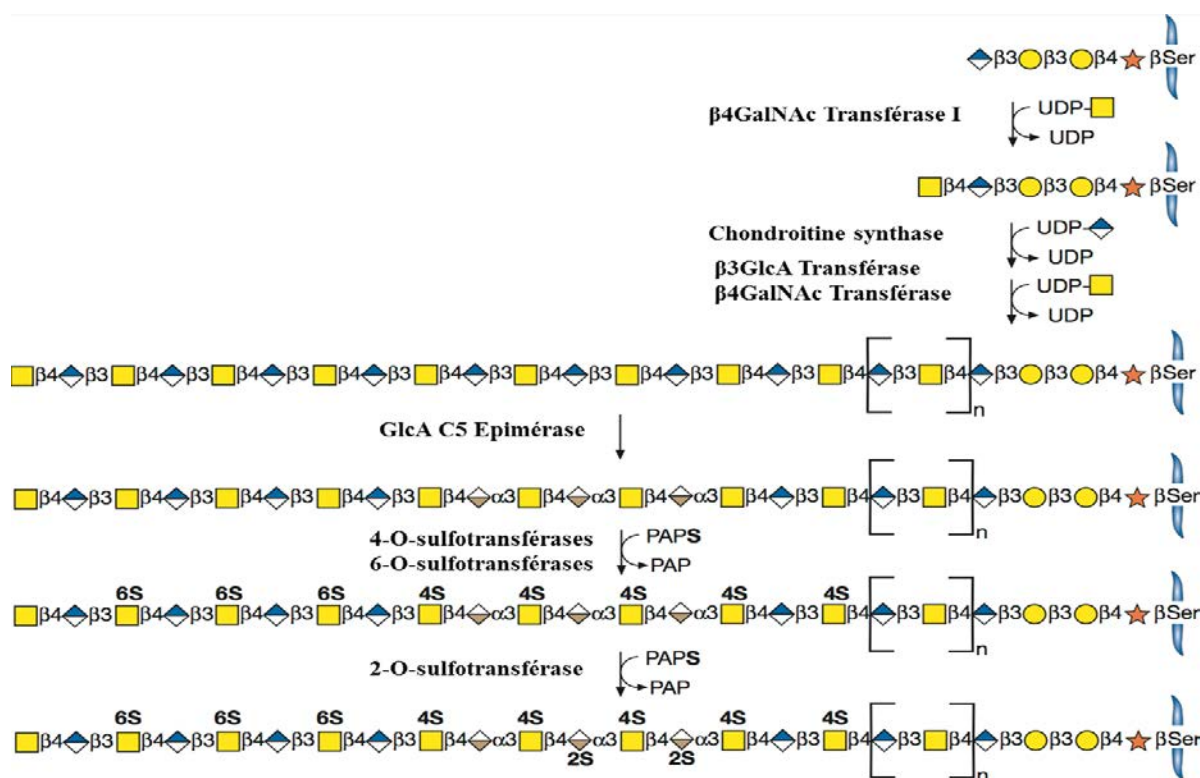
permet la différenciation des CS et des DS.

Le second type de modification majeure dans le cadre de la maturation des CS/DS est la sulfatation. Cette modification consiste au transfert de groupements sulfates sur les résidus osidiques constituant les chaînes polysaccharidiques à partir du 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) grâce à l'activité enzymatique de sulfotransférases. Le type de sulfatation le plus fréquemment trouvé sur les chaînes de CS/DS est la 4-O-sulfatation. Cette modification aboutit au transfert d'un groupement sulfate sur la position 4 des résidus N-acétylgalactosamine de ces chaînes (Figure 10). Si une seule enzyme, la dermatane 4-O-sulfotransférase-1 a été identifiée comme spécifique de la 4-O-sulfatation des DS (Mikami *et al.*, 2003), trois enzymes, nommées chondroïtine-4-O-sulfotransférase-1, 2 et 3 ont été identifiées pour la 4-O-sulfatation des CS (Mikami *et al.*, 2003 ; Hiraoka *et al.*, 2000 ; Yamauchi *et al.*, 2000), avec une importance fonctionnelle pour la chondroïtine-4-O-sulfotransférase-1 qui, avec la N-acétylgalactosaminyltransférase-2, semblerait jouer un rôle dans la régulation de la longueur de la chaîne de CS (Izumikawa *et al.*, 2011).

A côté des 4-O-sulfatations, des sulfatations en position 6 sur les résidus N-acétylgalactosamine des chaînes de CS ont été mises en évidence (Figure 10). L'enzyme responsable de cette 6-O-sulfatation est la chondroïtine-6-O-sulfotransférase-1 (Fukuta *et al.*, 1998). Toutefois, il est à noter qu'une chondroïtine-6-O-sulfotransférase-2, capable également de procéder à la sulfatation en position 6 des résidus N-acétylgalactosamine a été identifiée. Le niveau d'expression de cette dernière enzyme pourrait être régulé de façon tissu-spécifique, et ce en fonction du stade de développement (Kitagawa *et al.*, 2000). Dans certains cas, les chaînes de DS peuvent également être 6-O-sulfatées sur leur résidus N-acétylgalactosamine. L'enzyme qui semble être spécifique des chaînes de DS a été identifiée dans le sérum fœtal bovin, et son activité semble cibler spécifiquement les résidus N-acétylgalactosamine juxtaposant les résidus d'acide iduronique (Nadanaka *et al.*, 1999).

Pour rendre compte de toutes les possibilités de sulfatations des chaînes de sulfates de DS/CS, il est nécessaire de mentionner l'existence de l'uronyl 2-O-sulfotransférase et de la N-acétylgalactosamine-4-sulfate 6-O-sulfotransférase. L'uronyl 2-O-sulfotransférase, identifiée chez l'Homme il y a presque deux décennies, est capable de transférer un groupement sulfate sur la position 2 des résidus d'acide iduronique et glucuronique des chaînes de DS et CS, respectivement (Kobayashi *et al.*, 1997 et 1999) (Figure 10). Au contraire, l'activité de la N-acétylgalactosamine-4-sulfate 6-O-sulfotransférase résulte en la sulfatation en position O6 du

résidu 4-O-sulfaté (Ohtake *et al.*, 2001). L'activité de ces deux enzymes explique la double sulfatation de certains résidus parfois observée au sein des chaînes de CS/DS. Les intérêts biologiques de ces doubles sulfatations ne sont pas clairement établis. Toutefois, il a été suggéré que la double sulfatation aux positions 4 et 6 du résidu N-acétylgalactosamine pouvait constituer un signal possible de terminaison de l'élongation des chaînes. En effet, il a été montré dans des cellules chondrocytaires en culture issues d'un chondrosarcome chez le rat que la présence de résidus N-acétylgalactosamine-4,6-O-sulfatés était 60 fois plus élevée au niveau de l'extrémité non-réductrice des chaînes de CS de l'agrécan qu'à l'intérieur de la chaîne (Midura *et al.*, 1995). Allant dans ce sens, une étude réalisée chez l'Homme sur les CS extraits à partir de cartilage de genoux a montré qu'à partir de l'âge de 22 ans, environ 50% des chaînes de CS des agrécans étaient terminées par des résidus N-acétylgalactosamine-4,6-O-sulfatés, confirmant un possible rôle de ce type de résidu dans le mécanisme d'arrêt de la synthèse des chaînes (Plaas *et al.*, 1997).



**Figure 10 : Représentation schématique de la polymérisation et des modifications des chaînes de CS/DS.** La Biosynthèse de CS / DS implique la polymérisation des résidus N-acétylgalactosamine et l'acide glucuronique, et une série de réactions de modification comprenant la sulfatation et l'épimérisation de l'acide glucuronique en acide iduronique. La réaction de polymérisation et les modifications des chaînes de CS/DS sont réalisées simultanément. D'après Esko *et al.*, 2009



## II. 2.3 – Élongation et maturation des chaînes de sulfates d'héparanes/Héparine

### II. 2.3.1 – Élongation des chaînes de sulfates d'héparanes/Héparine

L'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAG vers les HS/Hp démarre par l'ajout d'un résidu N-acétylglucosamine à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine sur le résidu d'acide glucuronique situé à l'extrémité non-réductrice de la région tétrasaccharidique (Figure 9 et 11). Cette étape est clé dans l'orientation vers la biosynthèse des chaînes d'HS/Hp. L'enzyme initialement identifiée catalysant cette étape est la N-acétylglucosaminyltransférase I (Fritz *et al.*, 1994). Cette réaction est suivie par le transfert d'un résidu d'acide glucuronique sur le résidu de N-acétylglucosamine grâce à une activité enzymatique de type glucuronosyltransférase. L'élongation de la chaîne d'HS/Hp se poursuit ensuite par l'alternance des activités glucuronosyltransférase et N-acétylglucosaminyltransférase. Le système enzymatique nécessaire mis en jeu dans ces étapes d'élongation mérite d'être développé. En effet, les glycosyltransférases impliquées dans la polymérisation des chaînes d'HS/Hp appartiennent à des familles de protéines codées par une famille de gènes nommée *EXT*. Ces gènes « suppresseur de tumeur », lorsqu'ils sont mutés, sont responsables de la maladie des exostoses multiples qui se caractérise chez le patient par la présence d'exostoses au niveau des métaphyses des os longs. Les premières études ont permis d'identifier les loci *EXT1*, *EXT2* et *EXT3* localisés respectivement sur les chromosomes 8q, 11p et 19p et codant pour les exostosines 1, 2 et 3 (*EXT1*, *EXT2* et *EXT3*) respectivement (Ahn *et al.*, 1995 ; Cook *et al.*, 1993 ; Le Merrer *et al.*, 1994 ; Wu *et al.*, 1994). Un peu plus tard, des auteurs ont montré que les cellules L de souche sog9 chez la souris, incapables de synthétiser des chaînes de GAG, ne pouvaient être sensibles à l'infection par le virus de l'herpès (HSV-1) que lorsqu'elles ont été transfectées avec le l'ADNc codant pour l'EXT1 (McCormick *et al.*, 1998). Cette étude démontre que l'expression de l'EXT1, une protéine transmembranaire de type II résidant dans le réticulum endoplasmique, pouvait être suffisante pour exprimer les HS nécessaires à l'accrochage du virus HSV-1 à la surface des cellules L de souche sog9 chez la souris. La même année, d'autres auteurs ont réussi à purifier et identifier la protéine EXT2 à partir de sérum bovin et surtout de montrer que cette dernière protéine était capable des mêmes activités glycosyltransférases que l'EXT1 (Lind *et al.*, 1998). De façon plus importante, ces mêmes auteurs ont pu démontrer que la séquence de l'EXT2 présentait 94% d'identité avec celle l'humaine, sachant que la séquence de cette dernière présente environ 70% de similarité (incluant 30% d'identité) de séquence avec celle de l'EXT1 humaine (Lind

*et al.*, 1998). Ces travaux pris indépendamment démontrent qu'EXT1 et EXT2 sont deux enzymes intervenant dans la biosynthèse des chaînes d'HS et très probablement lors des étapes d'élongation puisqu'elles possèdent une double activité N-acétylglucosaminyltransférase et glucuronosyltransférase (Senay *et al.*, 2000). Au niveau cellulaire, il est remarquable de constater qu'EXT1 et EXT2 exercent leur activité enzymatique sous forme d'hétéro-oligomères et que dans ces conditions, l'activité enzymatique résultante est supérieure à celle obtenue lorsque chacune est exprimée séparément (McCormick *et al.*, 2000 ; Kobayashi *et al.*, 2000 ; Senay *et al.*, 2000). Ceci pourrait être expliqué par une meilleure mise en conformation et trafic vers l'appareil de Golgi sous forme hétéro-oligomérique, alors qu'elles sont retrouvées principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique lorsqu'elles sont surexprimées l'une sans l'autre (Senay *et al.*, 2000 ; McCormick *et al.*, 2000). Dans tous les cas, de par leur activité glucuronosyltransférase, EXT1 et EXT2 ne semblent pas constituer un système enzymatique suffisant dans l'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAG vers celle des HS. Des co-facteurs s'associant à l'une ou l'autre des enzymes de ce complexe enzymatique ont été recherchés. Si ce type de voie a été judicieusement exploré, d'autres études menées en parallèle sur la grande famille des gènes *EXT*, ont permis d'identifier 3 autres gènes analogues aux gènes *EXT* précédemment trouvés : *EXTL1*, *EXTL2* et *EXTL3* (Wise *et al.*, 1997 ; Wuyts *et al.*, 1997 ; Van Hul *et al.*, 1998). Des trois protéines, EXTL2 a été la première enzyme ayant montré une activité globale de type N-acétylhexosaminyltransférase capable de réaliser le transfert de la N-acétylglucosamine mais également de façon plus surprenante de la N-acétylgalactosamine. Cette enzyme a donc été suggérée comme étant celle responsable de l'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAG vers les HS (Kitagawa *et al.*, 1999). Son activité semble d'ailleurs correspondre celle de la N-acétylglucosaminyltransférase I, identifiée plus tôt comme une enzyme clé dans la biosynthèse des HS (Fritz *et al.*, 1994). Toutefois, une étude complète réalisée en utilisant des cellules issues de rein de singe (COS-1) exprimant de façon transitoire EXTL1 et EXTL3 ont montré des résultats intéressants et complétant un mécanisme plausible de la biosynthèse des HS. Ainsi, à l'instar de EXTL2, les deux enzymes ne présentent aucune activité de type glucuronosyltransférase indiquant leur implication exclusive dans l'initiation et/ou la polymérisation des HS. En outre, il a été montré que si EXTL3 est capable de transférer la N-acétylglucosamine sur un accepteur oligosaccharidique N-acétylhéparosan (mimant une chaîne de HS en cours de polymérisation) et un oligosaccharide de type GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-benzyloxycarbonyl (mimant

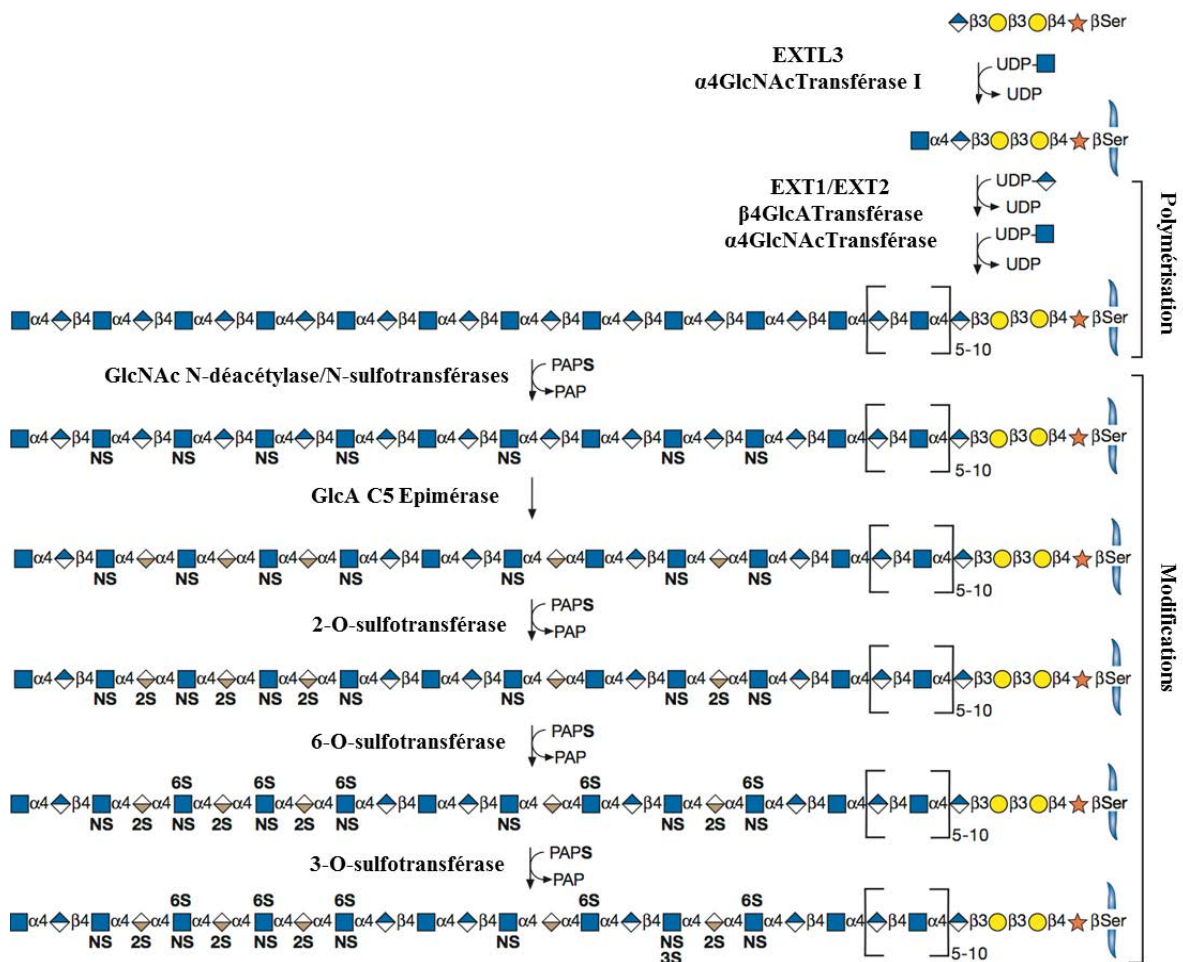
l'amorce tétrasaccharidique), EXTL1 n'est lui capable de reconnaître comme substrat accepteur que l'oligosaccharide N-acétylheparosan (Kim *et al.*, 2001). Il a donc été conclu à un mécanisme enzymatique au sein duquel EXTL2 possédant l'activité N-acétylglucosaminyltransférase I est responsable de l'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAG vers les HS, tandis que EXTL1, est plutôt l'enzyme responsable de l'élongation de la chaîne des HS avec une activité N-acétylglucosaminyltransférase II. De par sa capacité à accepter les deux types de substrats, EXTL3 a par conséquent été associée à la fois à l'orientation de la biosynthèse des chaînes de HS et à leur élongation.

## **II. 2.3.2 – Maturation des chaînes de sulfates d'héparanes/héparine**

### **II. 2.3.2.1 – N-désacétylation/N-sulfatation des chaînes de sulfates d'héparanes/héparine**

A l'instar des chaînes de CS, les chaînes de HS subissent de nombreuses modifications chimiques associées à leur maturation. La première modification consiste en une N-désacétylation concomitante à une N-sulfatation des résidus N-acétylglucosamine de la chaîne (Figure 11). Cette étape est catalysée par une famille d'enzymes bi-fonctionnelles nommées HS N-acétylglucosamine N-désacétylase/N-sulfotransférase (NDST) et consiste en un transfert d'un groupement sulfate provenant du PAPS sur l'azote d'une glucosamine. Quatre membres de cette famille ont été identifiés et nommés NDST-1 à 4. Les deux premières N-sulfotransférases ont été purifiées à partir du foie de rats (NDST-1) (Brandan *et al.*, 1988) mais également à partir de mastocytomes de souris produisant les héparines (NDST-2) (Pettersson *et al.*, 1991). Les ADNc ont par la suite été clonés chez le rat (Hashimoto *et al.*, 1992), et chez la souris (Eriksson *et al.*, 1994). Le gène codant pour la NDST-3 humaine a été découvert lors d'une recherche effectuée au sein d'une banque de d'ADNc de fœtus humain en s'appuyant sur la séquence de la NDST-1 humaine (Aikawa *et al.*, 1999). Enfin, l'ADNc codant pour la NDST-4 a été obtenu par criblage à partir d'une banque d'ADNc de la souris et de l'Homme en se basant sur l'homologie de séquence des NDST (Aikawa *et al.*, 2001). Le rôle et l'intérêt biologique de chacune de ces isoformes ne sont aujourd'hui pas complètement élucidés. Du point de vue enzymatique, une étude comparative réalisée chez la souris montre que la NDST-4 présente une faible activité désacétylase associée à une forte activité sulfotransférase, tandis que le comportement inverse a été observé pour la NDST-3 (Aikawa *et al.*, 2001). Ce déséquilibre des activités ne semble pas observé pour les NDST-1 et NDST-2

(Aikawa *et al.*, 2001). Dans d'autres études, il a été montré que si NDST-1 et NDST-2 sont exprimées de façon ubiquitaire, NDST-3 serait préférentiellement exprimée dans le cerveau, le foie et le rein (Kusche-Gullberg *et al.*, 1998 ; Aikawa *et al.*, 1999). En outre, il a été montré que les souris « knock out » pour le gène codant pour NDST-1 étaient incapables de biosynthétiser les chaînes d'HS et que ceci résultait en une létalité des embryons du fait de détresse respiratoire (Ringvall *et al.*, 2000). Au contraire, les souris « knock out » pour le gène de la NDST-2 maintenaient un certain niveau de biosynthèse de HS mais perdaient la capacité de synthétiser l'Hp, ce qui avait pour conséquence la formation de mastocytes anormaux (Forsberg *et al.*, 2001; Kjellén *et al.*, 2003). Ensemble, ces données suggèrent d'abord que selon le tissu et selon le stade du développement, certaines isoformes seraient plutôt impliquées dans l'étape de désacétylation tandis que d'autres seraient plutôt impliquées dans celle de la N-sulfatation. En outre, ces données indiquent fortement que la NDST-1 serait une enzyme majeure dans la biosynthèse des HS, tandis que la NDST-2 serait plutôt impliquée dans la biosynthèse de l'Hp. Les résultats de travaux récents vont d'ailleurs dans ce sens (Dou *et al.*, 2015 ; Ledin *et al.*, 2006 ; Presto *et al.*, 2008). Dans tous les cas, ces étapes de N-désacétylation/N-sulfatation sont cruciales puisqu'elles permettent la réalisation des autres modifications caractéristiques des chaînes de HS/Hp (Figure 11).



**Figure 11 : Représentation schématique de la polymérisation et des modifications des chaînes de HS/Hp.** La synthèse des chaînes d'HS requiert la copolymérisation de la N-acétylglucosamine et de l'acide glucuronique. Ces chaînes subissent une série de réactions de modifications incluant la sulfatation et l'épimérisation de l'acide glucuronique en acide iduronique. D'après Esko *et al.*, 2009

### II. 2.3.2.2 – C5 épimérisation de l'acide glucuronique

Dans cette série de modifications, l'épimérisation du carbone C5 de l'acide glucuronique en acide iduronique est également une étape importante dans la biosynthèse des chaînes de HS/Hp (Figure 11). Cette étape est catalysée par l'enzyme uronyl-C5-épimérase. L'enzyme a été purifiée pour la première fois à partir du foie de bovin dans sa forme tronquée soluble (Campbell *et al.*, 1994), tandis que l'ADNc complet a été cloné pour la première fois chez la souris et chez l'Homme en 2001 (Li *et al.*, 2001 ; Crawford *et al.*, 2001). Comme de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse et la maturation des GAGs, l'uronyl-C5-épimérase est une protéine transmembranaire localisée dans le Golgi (Li *et al.*, 2001 ; Crawford *et al.*, 2001). En outre, l'isomérase identifiée semble à nos jours être la seule isoforme d'enzyme capable de réaliser cette réaction d'isomérisation ciblant spécifiquement

les chaînes de HS/Hp. Bien que l'enzyme catalyse une réaction réversible, il est à noter que la présence de 2-O-sulfatations mais également de 6-O-sulfatations sur les chaînes de HS/Hp suffit à inhiber l'activité de l'enzyme (Lindahl *et al.*, 1989), ce qui a été confirmé très récemment grâce à une étude structure-fonction poussée (Qin *et al.*, 2015). Ainsi, si *in vitro*, la réaction est définitivement réversible, il semble qu'*in vivo* elle ne soit pas (Li *et al.*, 2010). Des auteurs ont ainsi montré par exemple que l'enzyme présentait un mode bi-phasique en fonction de la structure du substrat, et pouvait agir de façon réversible ou irréversible (Sheng *et al.*, 2012). Cet activité bi-phasique de l'enzyme pourrait être corrélé avec sa capacité d'interagir avec la 2-O-sulfotransférase dans le cadre par exemple de la biosynthèse de domaines à la fois 2-O-sulfatés et C5-épipimérisés au sein des HS/Hp (Préchoux *et al.*, 2015).

### II. 2.3.2.3 – Le processus de 2-O-sulfatation

Une étape importante dans la maturation des chaînes de HS/Hp est l'étape de 2-O-sulfatation (Figure 11). Comparativement aux chaînes de CS/DS, cette étape est également réalisée au moyen de sulfotransférases et affecte certains sites spécifiques au sein des unités disaccharidiques de la chaîne de GAG. Le premier type de sulfatation affecte la position C2 du résidu d'acide iduronique. L'enzyme impliquée est la 2-O-sulfotransférase. Cette enzyme, spécifique des chaînes de HS (Kobayashi *et al.*, 1999), a été purifiée à partir d'une lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster chinois (CHO) (Kobayashi *et al.*, 1996) tandis que l'ADNc a été cloné en s'appuyant sur la séquence peptidique de la protéine (Kobayashi *et al.*, 1997). Brièvement, l'enzyme accepte pour substrat accepteur l'acide iduronique, mais dans une moindre mesure l'acide glucuronique (Bai *et al.*, 1996). Le rôle biologique spécifique à ce processus de 2-O-sulfatation n'est pas encore très clair aujourd'hui. Il a par exemple été suggéré que ce processus intervenait dans le « turn-over » des chaînes d'HS en agissant probablement comme signal de clivage vis-à-vis des héparanases (Bai *et al.*, 1997). Au niveau cellulaire, des études plus récentes ont par ailleurs montré que la 2-O-sulfatation était importante dans les processus d'adhésion cellulaire et de cycle cellulaire durant les étapes précoces de développement du poisson-zèbre en régulant les voies de signalisation liées à Wnt (Cadwalader *et al.*, 2012) ou encore dans les processus de migration cellulaire dans le contexte du développement chez *Caenorhabditis elegans* (Kinnunen *et al.*, 2005). Ces récentes données renvoient aux premières observations faites chez la souris montrant que l'inactivation de l'HS-2-O-sulfotransférase par mutation générée par « gene trapping »

aboutissaient à une létalité néonatale et surtout à l'absence de reins (Bullock *et al.*, 1998). Les tendances indiquent clairement que la 2-O-sulfatation des chaînes de HS jouerait un rôle important durant les stades précoces de développement. Ces affirmations doivent tout de même être circonstanciées dans la mesure où des travaux effectués sur des cellules de souris mutantes pour le gène codant pour l'enzyme, conservent dans une certaine mesure leur capacité à fixer certains facteurs de croissance du fait de l'existence d'un mécanisme adaptatif associé à une augmentation des N- et des 6-O-sulfatations (Merry *et al.*, 2001) pouvant expliquer que la déficience d'activité en 2-O-sulfotransférase puisse n'avoir qu'un impact modéré sur l'ensemble des organismes excepté le rein.

#### II. 2.3.2.4 – Le processus de 6-O-sulfatation

Le second type de sulfatation à considérer dans le cadre de la maturation des chaînes d'HS est la 6-O-sulfatation (Figure 11). L'enzyme impliquée est la 6-O-sulfotransférase spécifique des HS/Hp (Habuchi *et al.*, 2000). Cette dernière a été purifiée à partir de la culture de lignée cellulaire CHO (Habuchi *et al.*, 1995), tandis que son ADNc a été cloné en s'appuyant sur la séquence peptidique (Habuchi *et al.*, 1998). Dans les faits, une importante étude réalisée chez la souris montre l'existence de trois isoformes de la 6-O-sulfotransférase. Les ADNc ont été criblés par hybridation avec l'ADNc humain correspondant dans une banque de cerveau de souris. Ainsi, il a été montré que l'isoforme 1 présentait respectivement 51 et 57% d'identité avec l'isoforme 2 et 3, tandis que l'isoforme 2 présentait environ 50% d'identité avec l'isoforme 3 (Habuchi *et al.*, 2000). En outre, les auteurs ont indiqué que si l'isoforme 1 utilisait préférentiellement les acides iduroniques impliqués dans des unités disaccharidiques avec des résidus N-sulfo-glucosamine, l'isoforme 2 favoriserait les substrats accepteurs incluant les acides glucuroniques tandis que l'isoforme 3 accepterait l'un ou l'autre des substrats indistinctement (Habuchi *et al.*, 2000). A ces subtiles différences fonctionnelles, s'ajoute une hétérogénéité de la distribution de l'expression de ces isoformes au sein de l'organisme. En effet, il semble que si l'isoforme 1 est fortement exprimée dans le foie de la souris, l'isoforme 2 semble être préférentiellement exprimée dans le cerveau et dans la rate tandis que l'isoforme 3 serait exprimée de façon ubiquitaire (Habuchi *et al.*, 2000). Ensemble, ces données suggèrent fortement que les rôles et expressions de ces 6-O-sulfotransférases sont régulés de façon tissu-spécifiques. En outre, quelques études récentes indiquent que leur rôle pourrait également être régulé de façon temporelle et notamment durant les phases du

développement de la souris par exemple. Il a été montré en effet qu'une déficience en activité 6-O-sulfotransférase 1 (isoforme 1) et/ou 2 provoquait chez la souris un développement anormal de l'embryon : angiogenèse anormale au niveau de la zone labyrinthe du placenta, développement anormal des poumons associé à un fort niveau de mortalité au stade embryonnaire avancé (Habuchi *et al.*, 2010 ; Habuchi *et al.*, 2007). Ce rôle important des 6-O-sulfatations catalysées par les 6-O-sulfotransférases 1 et 2 provient très certainement de leur capacité à biosynthétiser des chaînes d'HS 6-O-sulfatés capables d'activer certains facteurs de croissance (FGF2 et le facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGF) dans le cadre de la régulation du processus d'angiogenèse par exemple (Ferrerias *et al.*, 2012), ou encore dans la progression des processus tumoraux de type chondrosarcome (stade 3) (Waaijer *et al.*, 2012).

#### II. 2.3.2.5 – Le processus de 3-O-sulfatation

Le dernier type de sulfatation observé au sein des chaînes de HS/Hp est la 3-O-sulfatation (Figure 11). Il est à noter que ce type de modification est rare (Pejler *et al.*, 1987 ; De Agostini *et al.*, 2008), et qu'il s'agit d'une des dernières modifications de la série affectant les HS/Hp (Zhang *et al.*, 2001). Les enzymes qui catalysent cette réaction sont codées à partir d'une famille de gènes générant jusqu'à 7 isoformes divisées en deux sous-groupes en s'appuyant sur les homologies du domaine sulfotransférases (Liu *et al.*, 2007). Les isoformes 3-O-sulfotransférase-2, 3A, 3B, 4 and 6 ont été regroupés dans un premier sous-groupe, d'une part parce qu'ils présentent au moins 80% d'identité de séquence avec le domaine sulfotransférase commun (Lawrence *et al.*, 2007), et d'autre part parce qu'ils sont capables de par leur activité de générer des sites de fixations pour la glycoprotéine gD du virus de l'herpès de type I (Shukla *et al.*, 1999, Xia *et al.*, 2002, Tiwari *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2005 and O'Donnell *et al.*, 2006). Au contraire, les 3-O-sulfotransférase-1 et 5 ont été placés dans un sous-groupe distinct puisqu'ils ne partagent qu'environ 71% d'identité de séquence avec le domaine sulfotransférase commun et surtout parce qu'ils génèrent des sites de liaisons pour l'antithrombine (Xia *et al.*, 2002). Il est également à noter que l'expression de chacune des isoformes responsables de l'activité 3-O-sulfotransférase est régulée et contrôlée très précisément dans le temps et de façon tissu-spécifique. Ainsi, si les isoformes 1, 3A et 3B sont exprimées de façon ubiquitaire, les isoformes 2 et 4 seraient plutôt exprimées dans le cerveau (Shworak *et al.*, 1999, Lawrence *et al.*, 2007 ; Mochizuki *et al.*, 2003). Enfin,



l'isoforme 5 serait préférentiellement exprimée dans le muscle squelettique (Xia *et al.*, 2002) tandis que l'expression de l'isoforme 6 serait prédominante dans le foie ou encore le rein (Xu *et al.*, 2005). Compte tenu de ces données, il n'est pas surprenant de constater que chacune de ces isoformes présente des spécificités préférentielles selon le type de substrats accepteurs. Par exemple, l'isoforme 1 catalyse spécifiquement la 3-O-sulfatation des résidus glucosamine à condition que ce dernier résidu soit associé du côté de l'extrémité non-réductrice, à un acide glucuronique, ou dans une moindre mesure à un acide iduronique, dépourvu de la présence de sulfate en position C2 (Liu *et al.*, 1996 ; Shworak *et al.*, 1997 ; Mochizuki *et al.*, 2008). Au contraire, les isoformes 2, 3A et B, 4 et 6 réagissent préférentiellement avec les mêmes sites mais au niveau duquel l'acide iduronique est 2-O-sulfaté ( Liu J *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2005 ; Lawrence *et al.*, 2007 ; Mochizuki *et al.*, 2008). Enfin, il apparaît que l'isoforme 5 réalise la 3-O-sulfatation des résidus glucosamine sans tenir compte du caractère 2-O-sulfaté du résidu d'acide uronique (Liu *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Mochizuki *et al.*, 2003, Chen et Liu 2005, Mochizuki *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008).

Il aurait été impensable de traiter du processus de la 3-O-sulfatation sans discuter au moins brièvement de l'importance de ce processus du point de vue biologique et physiologique. En effet, si de nombreux travaux démontrent le rôle de ce type de sulfatation dans le contexte du développement embryonnaire (Hirano *et al.*, 2012 ; Irie *et al.*, 2003), il est à noter que le processus de 3-O-sulfatation est également connu depuis plusieurs décennies responsable de l'hémostase. La 3-O-sulfatation concoure en effet à la génération de sites capables de fixer l'antithrombine au sein des chaînes de HS/Hp (Lindahl *et al.*, 1980). Pour rappel, l'antithrombine est connu pour être inhibiteur de la coagulation en agissant sur la thrombine, le facteur IXa et le facteur X, et également comme facteur inhibant les processus de l'inflammation mais également de l'angiogenèse (O'Reilly *et al.*, 1999 ). Une étude a ainsi suggéré que l'interaction de l'antithrombine avec des sites 3-O-sulfatés situés au sein des chaînes de HS provoquait un changement de sa conformation à l'origine de son activité physiologique (Rosenberg *et al.*, 1973).

Dans un tout autre contexte, la 3-O-sulfatation est responsable de la sensibilité de certaines cellules à l'infection par le virus de l'herpès (HSV-1). Les site 3-O-sulfatés par les isoformes 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6 sont en effet reconnus par le glycoprotéine D de l'enveloppe du virus et servent de sites d'attachement et d'entrée pour ce dernier (Shukla D. *et al.*, 1999).

Un autre contexte particulier à évoquer concerne le rôle des HS-3-O-sulfatés dans la capacité

des cellules à interagir avec les FGFs. Jusqu'à présent, l'intervention des HS 3-O-sulfatés dans l'interaction de ces facteurs de croissance avec leurs récepteurs n'a pas pu être démontré directement mais plusieurs travaux suggèrent une telle intervention notamment avec les FGF7 et 10. Ainsi, il a été montré par exemple que sur une population moléculaire totale d'Hp produite, la fraction présentant la plus forte affinité pour l'antithrombine contribue à l'interaction entre les facteurs de croissance des fibroblastes 1 et 2 avec le récepteur au facteur de croissance 1 (McKeehan *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001). Le rôle fonctionnel de ces domaines 3-O-sulfatés dans l'interaction des facteurs de croissance avec leur récepteurs positionne le processus de la 3-O-sulfatation et donc les 3-O-sulfotransférases comme un élément régulateur clé de nombreux événements cellulaires dans le développement embryonnaire (Neugebauer 2013), mais également au cours processus physiopathologique tels que les cancers du sein (Vijaya Kumar *et al.*, 2014 ; Gauche *et al.*, personal data) ou encore le cancer du pancréas (Song *et al.*, 2011).

Pour conclure sur cette partie, il est important de mettre en avant que la biosynthèse des chaînes de GAG est un processus extrêmement complexe loin d'être un simple enchaînement d'activités enzymatiques. En effet, de nombreuses modifications biochimiques viennent s'ajouter aux activités des glycosyltransférases, jouant des rôles régulateurs clés à toutes les étapes de la biosynthèse. Il serait évidemment tentant et confortable d'associer les sulfotransférases à de simples régulateurs de la biosynthèse et de n'attribuer aux glycosyltransférases qu'un simple rôle dans la catalyse de la polymérisation des chaînes de GAG. Cependant, cette approche simplificatrice peut être aujourd'hui remise en cause dans la mesure où de nombreuses études montrent des interactions directes entre les différentes catégories d'enzymes. Il est d'ailleurs envisagé que les différents partenaires enzymatiques soient regroupés au sein même du Golgi sous la forme de multimères fonctionnels et finement (auto)régulés nommés les GAGosomes. Si ce concept reste encore peu développé, il serait désormais nécessaire de considérer l'existence de telles régulation grâce ces interactions inter-enzymatique (coopérativité/anti-coopérativité) en parallèle de ceux classiquement évoqués ou décrits dans des conditions *in vivo*.

Dans le cadre de ce travail, nous avons fait le choix d'orienter nos études vers les glycosyltransférases puisque ces enzymes restent les moteurs de la biosynthèse des chaînes de GAG et puisque toute modification affectant leur activité impacte directement la capacité de la cellule à synthétiser ses chaînes de GAG.

## Chapitre III : Les glycosyltransférases

### III.1-Généralités

En raison de la nature de nombreuses fonctions cellulaires, dans lesquelles les complexes glucidiques agissent comme transducteur de signal dépendant des structures glucidiques, la biosynthèse des sucres complexes implique l'action d'un large éventail de glycosyltransférases (GTs), générant un nombre infini de glycoconjugués et de polysaccharides (Aharoni *et al.*, 2006). Les GTs catalysent le transfert d'un résidu monosaccharidique à partir d'un sucre nucléotidique dit « donneur » sur des molécules spécifiques dites « acceptrices », incluant par exemple des lipides, des saccharides ou des protéines conduisant à la formation d'une liaison osidique (Hashimoto *et al.*, 2009). Les transférases dépendantes d'un sucre représentent la grande majorité des réactions de transfert de type glycosyl. Et même si la gamme de molécules acceptrices est très diversifiée, les substrats donneurs sont généralement limités à des monosaccharides liés à un nucléoside monophosphate ou diphosphate (NPD) tel que l'Uridine diphosphate (UDP), la guanosine diphosphate (GDP), et la cytidine monophosphate (CMP) (Thorose *et al.*, 2005). Ainsi, parmi les glycosyltransférases, les UDP-glycosyltransférases (UGT) comptent pour plus de 60% de toutes les GTs caractérisées à ce jour (Hu *et al.*, 2002).

### III.2-Classification des glycosyltransférases

#### III.2.1- Classification selon le repliement structural des glycosyltransférases

Malgré une grande diversité au niveau de leurs séquences, les GTs, peuvent être groupées dans deux familles structurales distinctes (GT-A et GT-B) en se basant sur leur repliement tridimensionnel (Hashimoto *et al.*, 2010, Figure 12). Ces observations indiquent que l'ensemble des GTs connus est issu de l'évolution d'un petit nombre de séquences progénitrices (Coutinho *et al.*, 2003).

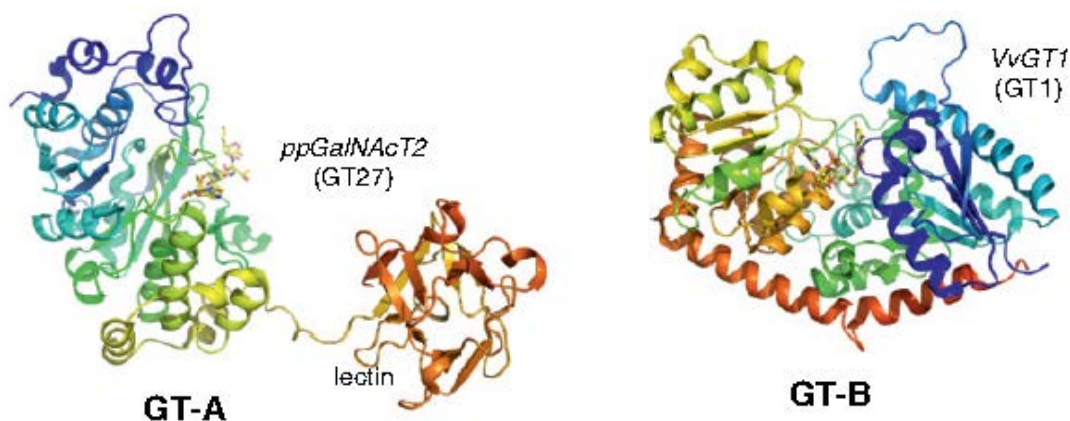
##### III.2.1.1- Le repliement GT-A

Les membres de cette famille possèdent deux domaines  $\beta/\alpha/\beta$  distincts mais très proches, souvent considérés comme un seul domaine, créant un site actif au centre. Le domaine N-terminal possède un motif commun DXD ou EXD (Asp-X-Asp ou Glu-X-Asp) flanqué par des résidus non polaires. Le motif DXD interagit généralement avec le groupement phosphate

du substrat donneur *via* un ion métallique bivalent. Le substrat accepteur se lie généralement au niveau du domaine C-terminal de l'enzyme. Les membres de la famille GT-A ont en grande partie été caractérisés. Il est cependant à noter qu'une enzyme de cette famille a été décrite ne possédant pas cette signature (Leukocyte type core 2 beta 1,6-N-acétylglucosaminyltransférase). Dans cette enzyme, les résidus arginine et lysine de la chaîne latérale seraient impliqués dans la stabilisation électrostatique du nucléoside diphosphate du groupe partant, qui est normalement le rôle de la méthionine chez les membres de la famille GT-A (Pak *et al.*, 2006). Des différences ont aussi été observées dans la fonction des résidus conservés du motif DXD concernant le mécanisme catalytique des GT-A (par rétention ou inversion de configuration). En général, les deux résidus Asp interagissent avec le cofacteur métallique dans le cas d'un mécanisme avec rétention de configuration, alors que dans le cas d'une réaction avec inversion, seul le deuxième Asp interagit avec l'ion métallique (Breton *et al.*, 2006).

### **III.2.1.2- Le repliement GT-B**

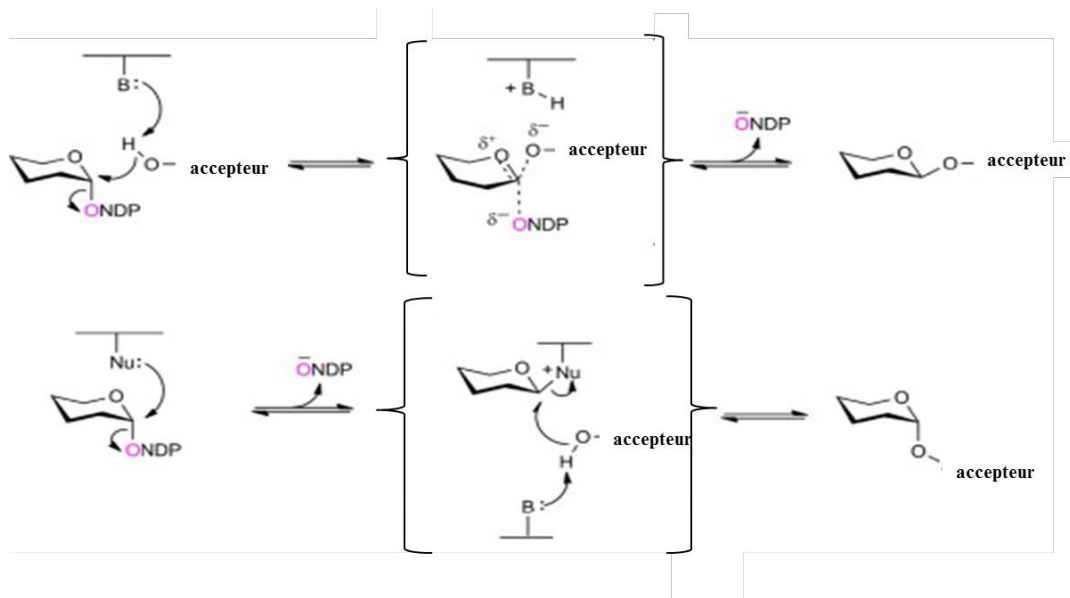
La deuxième structure des GTs (GT-B) a été étudiée pour la première fois dans la T4  $\beta$ -glycosyltransférase. Les membres de cette famille possèdent deux domaines séparés de type *Rossmann-Like*  $\beta/\alpha/\beta$  avec une région de liaison profonde servant de centre catalytique (Shao *et al.*, 2005). Contrairement à la famille des GT-A, le domaine C-terminal est le domaine de liaison de la partie nucléotidique du substrat donneur. Quant au domaine N-terminal, les séquences sont différenciées en fonction de l'enzyme considérée ou encore de l'espèce étudiée (Kapitonov *et al.*, 1999). Chez les procaryotes, la plupart des GTs appartient à cette famille et servent essentiellement à la synthèse de la paroi cellulaire (Thibodeaux *et al.*, 2007).



**Figure 12 : Les deux principaux types de repliements des GTs.** Les enzymes GT-A, généralement « métal dépendantes », avec un motif DXD caractéristique, sont constituées de deux domaines de Rossmann étroitement liés. Les enzymes GT-B sont « métal-indépendantes », et possèdent deux domaines  $\beta/\alpha/\beta$  séparés par une fente et une région flexible. Le repliement GT-A est représenté par le ppGalNAc T2 (GT27), le polypeptide N-acétylglucosaminyltransférase T2. Le repliement GT-B est représenté par la VvGT1 (GT1) une glycosyltransférase du raisin. D'après Breton et al., 2012

Un autre système de classification reconnu est, lui, basé sur la similarité des séquences des acides aminés (Campbell et al., 1997) et constitue une base de données des enzymes utilisant des glucides (Cantarel et al., 2009). Ce système comprend des enzymes avec des rôles dans le métabolisme, la biosynthèse et la modification des glucides, et comporte quatre classes d'enzymes : les hydrolases, les glycosyltransférases, les lyases, et les estérases. Chaque classe est divisée en familles qui regroupent des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières (par exemple, la stéréochimie de la liaison glycosidique). Ainsi les membres d'une même famille possèdent des similarités de repliement structural tridimensionnel (appelées « folds »), et un même mécanisme catalytique (Luzhetskyy et al., 2005). Cependant, cette classification suivant les similarités de séquences ne permet pas de prédire le mécanisme catalytique (Osmani et al., 2009). Pour améliorer ce système, Coutinho et al., (2003) ont proposé de sous-classer les GTs en quatre classes en prenant en compte la classification structurale GT-A et GT-B, ainsi que leur propriété d'inversion ou de rétention de la réaction (Figure 13).

Pour aller plus loin, les GTs ont été classées en 92 familles CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)), avec plus de 50 000 cadres de lectures codant pour plusieurs GTs isolées à partir de divers plantes, mammifères, et sources procaryotes.



**Figure 13 : Mécanisme de la réaction catalysée par les GTs.** A : Réaction enzymatique catalysée par les GTs qui induisent une inversion de la configuration du glycoside en C1. B : Réaction avec rétention de la configuration du glycoside donneur. D'après Malik *et al.*, 2012.

### III.2.2- Classification selon le mécanisme catalytique

L'augmentation rapide du nombre de projets étudiant le génome humain nous a permis d'acquérir d'importantes informations sur les séquences et la biochimie des GTs. Ainsi, d'autres systèmes de classifications des GTs ont été proposés.

L'un de ces systèmes de classification des GTs s'appuie sur le mécanisme enzymatique et notamment sur leur propriété d'inversion ou de rétention de l'anomérie du C1 du sucre à transférer sur le substrat accepteur (lipidique, osidique ou protéique). En effet, selon la configuration anomérique du substrat donneur, le produit formé peut garder la configuration anomérique de départ ou subir une inversion de configuration (Kapitonov *et al.*, 1999).

Une autre classification consiste à distinguer les GTs en fonction de la nature du sucre donneur impliqué dans la réaction (Compain *et al.*, 2001). Certaines GTs ont ainsi été classées dans celles appartenant à la voie de Leloir (M. Luis Federico Leloir, Prix Nobel de Chimie) suite à sa découverte de la biosynthèse de l'UDP-D-glucose et des glycosides. Environ 65% des GTs suivent le mécanisme de Leloir dans lequel les substrats donneurs sont essentiellement des sucres nucléotidiques (Weijers *et al.*, 2008).

### **III.3-Les galactosyltransférases**

#### **III.3.1- Généralités**

Les galactosyltransférases (GalTs) sont membres de la famille des GTs. Plusieurs familles et sous-familles de GalTs ont été clonées, et leurs spécificités de substrats ont été identifiées et décrites (Ten Hagen *et al.*, 2003). Toutes les GalTs utilisent l'UDP- $\alpha$ -D-Gal comme substrat donneur, et forment des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ 1-4,  $\beta$ 1-3,  $\alpha$ 1-3 et  $\alpha$ 1-4 avec le galactose. Ainsi, en s'appuyant sur la nature de la liaison osidique formée par ces enzymes, les GalTs ont été classées en quatre sous-familles : les  $\beta$ 4GalTs, les  $\beta$ 3GalTs, les  $\alpha$ 3GalTs et les  $\alpha$ 4GalTs respectivement. Chaque sous-famille est elle-même composée de différents membres identifiés par des chiffres (exemple les  $\beta$ 4GalT1, 2, 3, etc...). La sous-famille  $\beta$ 4GalT est ainsi constituée de sept membres nommés de GalT1 à GalT7 (Hennet *et al.*, 2002) présentant entre 25 et 55 % d'homologie de séquences. Il est à noter que chaque membre d'une sous-famille est exprimé de façon tissu spécifique et montre des différences de spécificité vis-à-vis du substrat accepteur (Qasba *et al.*, 2008). Des absences ou altérations de l'activité enzymatique de certains membres de cette sous-famille ont souvent été associées à différentes pathologies impliquant des défauts de glycosylation, comme les CDG (*Congenital Disorders of Glycosylation*) (Freeze *et al.*, 2005) ou encore à des maladies génétiques dans lesquelles ces GTs sont mutées comme la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers Danlos (Götte *et al.*, 2005 ; Bui *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la famille des  $\beta$ 4GalTs.

#### **III.3.2- La famille des $\beta$ 4GalTs**

Comme toutes les GTs de l'appareil de Golgi, les  $\beta$ 4GalTs sont ancrées dans la membrane de ce compartiment *via* leur région N-terminale (protéines présentant une organisation membranaire de type II). La topologie structurale commune des  $\beta$ 4GalTs est la suivante : une courte queue N-terminale cytoplasmique, un unique domaine d'ancrage transmembranaire, une structure ressemblant à une tige (appelée région « *stem* ») et un large domaine carboxy-terminal catalytique. Les deux derniers domaines sont généralement positionnés dans la lumière de l'appareil de Golgi (Figure 14). Cette orientation leur permet de glycosyler les protéines au cours de leur voie de sécrétion en passant par le lumen du Golgi. La taille de la région cytoplasmique des GTs est variable. Chez les membres de la famille des  $\beta$ 4GalTs, cette dernière est longue d'environ 8-24 résidus. La troncation du domaine cytoplasmique n'affecte

pas la synthèse de la protéine ou sa localisation dans le Golgi (Masibay *et al.*, 1993). En revanche, le domaine transmembranaire doit être intact pour une bonne localisation des  $\beta$ 4GalTs dans le Golgi (Tang *et al.*, 1992). Une délétion au niveau de la région tige affecte en effet la stabilité de la protéine (Masibay *et al.*, 1993). Étant donné que le domaine transmembranaire de toutes les protéines membranaires doit interagir avec la bicouche lipidique au niveau du site de leur synthèse de façon à se déplacer le long de la voie de biosynthèse, la nature hydrophobe des domaines transmembranaires de ces protéines joue un rôle important dans leur mécanisme de tri et de ciblage. Le profil hydrophobe des segments transmembranaires des GTs de l'appareil de Golgi se révèle être plus court par rapport aux domaines transmembranaires des protéines de la membrane plasmique. L'augmentation de la taille du domaine transmembranaire des GTs golgiennes par des techniques d'ingénierie génétique, perturbe le signal de localisation dans le Golgi et dirige l'enzyme vers la membrane plasmique, ce qui suggère que la taille de la région hydrophobe est un paramètre important pour la localisation dans la membrane golgienne. Ainsi, il a été proposé qu'en raccourcissant le domaine transmembranaire, les GTs peuvent interagir avec une bicouche lipidique plus mince au niveau de leur site de synthèse, alors que les domaines transmembranaires plus longs pourraient interagir avec des couches lipidiques plus épaisses initiant ainsi leur tri et leur déplacement vers leur propre compartiment cellulaire. Ces données sont confirmées dans la publication de Masibay *et al.*, (1993) qui étudie par analyse mutationnelle des domaines transmembranaires et leurs effets sur le signal de localisation des GalTs au niveau du Golgi.



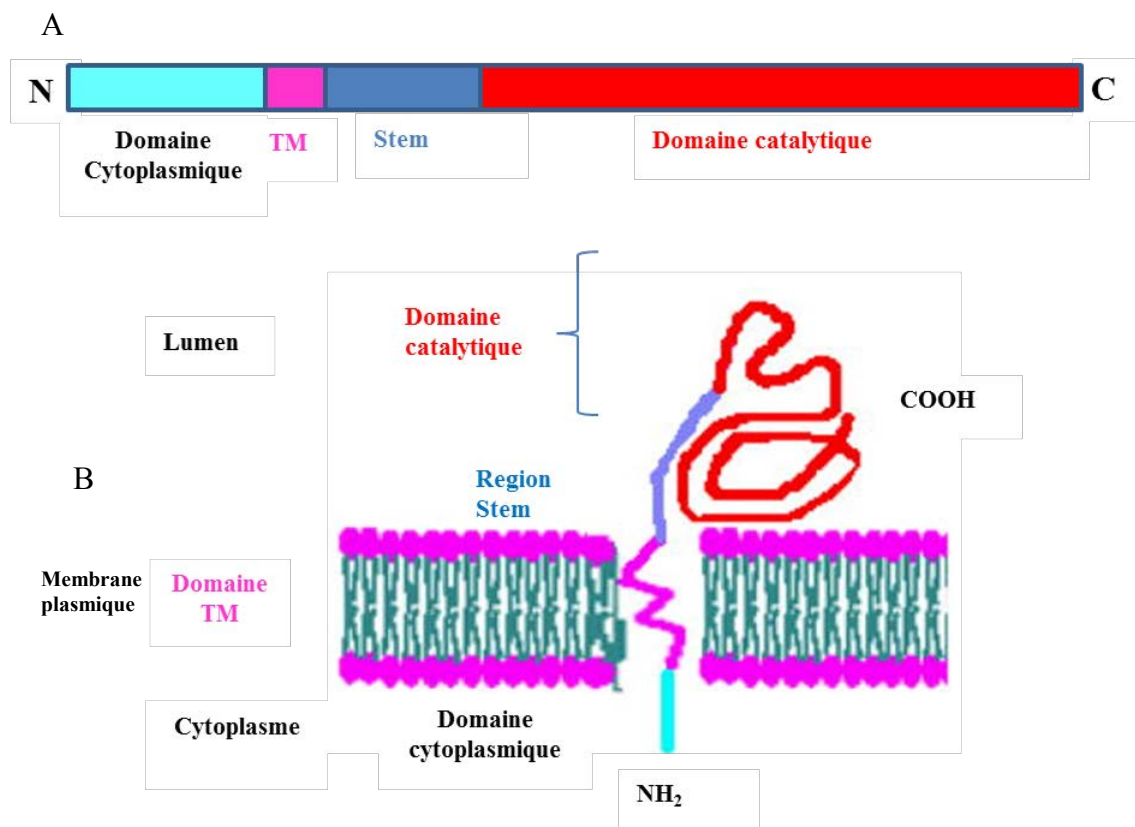
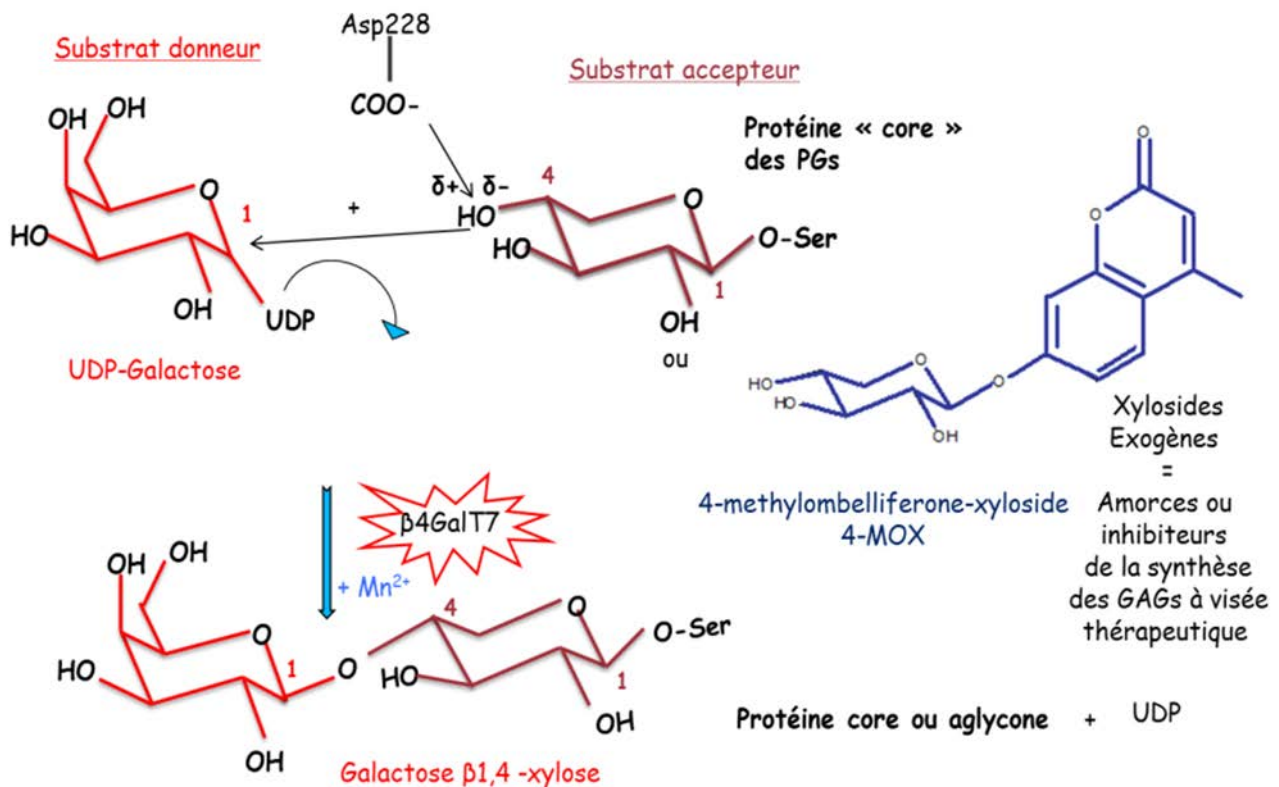


Figure 14 : Organisation modulaire (A) et membranaire (B) des enzymes de la famille des  $\beta$ 4GalTs. Le domaine cytoplasmique est en cyan, un court domaine transmembranaire (TM) en rose, une région stem en bleu, et le domaine catalytique contenant les sites de fixation des substrats en rouge.

### III.3.3- La $\beta$ 4GalT7

#### III.3.3.1- Généralités

La  $\beta$ 4GalT7 est un membre de la famille des  $\beta$ 4GalTs. C'est une enzyme impliquée dans les étapes précoces de la biosynthèse des PGs. En présence des ions manganèse (II), elle catalyse le transfert du galactose à partir de l'UDP-Gal sur le résidu xylose déjà greffé sur la protéine porteuse d'un PG (Figure 15). La  $\beta$ 4GalT7 possède la capacité unique *in vitro* et *in vivo*, d'initier les voies de biosynthèse des GAGs à partir de substrats xylosidiques exogènes comprenant un xylose lié à une aglycone hydrophobe mimant ainsi la protéine-*core* des PGs (Esko *et al.*, 1987).



**Figure 15 : Représentation schématique de la réaction enzymatique catalysée par la  $\beta 4\text{GalT7}$  humaine.** La  $\beta 4\text{GalT7}$  attaque l'hydroxyle en position 4 du xylose pour lui arracher un proton par l'intermédiaire de son résidu Asp228 (base catalytique). A son tour l'oxygène en position 4 du xylose (substrat accepteur) attaque la position 1 de l'UDP-galactose (substrat donneur) pour libérer, en présence d'ions  $\text{Mn}^{2+}$ , le disaccharide [galactose- $\beta 1,4$ -xylose] lié à la protéine-core du PG ou à une aglycone hydrophobe (produit 1) et l'UDP (produit 2).

### III.3.3.2- Analyse génomique de la $\beta 4\text{GalT7}$

Le clonage de la  $\beta 4\text{GalT7}$  humaine a été réalisé en 1999 par Almeida *et al.* Le gène B4GALT7 est organisé en six exons (des paires de bases 1-50, 51-413, 414-639, 640-723, 724-828 et 829-984) comme les autres membres de la famille des  $\beta 4\text{GalT}$ , mais avec séquences nucléotidiques qui ne sont pas conservées au niveau des cinq domaines qui bordent les régions séparant les introns et les exons, comme elles peuvent l'être dans les  $\beta 4\text{GalT1}$  à -4. L'identification et le clonage de la  $\beta 4\text{GalT7}$  humaine par la méthode EST (*Expression Sequence Tags*) a révélé un gène possédant un cadre de lecture codant une protéine de 327 acides aminés présentant une masse moléculaire apparente d'environ 37 kDa. La région codante de la  $\beta 4\text{GalT7}$  possède un seul codon d'initiation suivi d'une séquence codante pour les domaines cytoplasmique et transmembranaire. Une fois exprimée, la  $\beta 4\text{GalT7}$  est une glycoprotéine transmembranaire présentant une topologie membranaire de type II avec un

domaine N-terminal cytoplasmique de 28 acides aminés, un segment transmembranaire de 30 résidus, et une région stem suivie d'un domaine catalytique de 269 résidus. L'alignement de séquences des sept  $\beta$ 4GalTs humaines montre des différences importantes au niveau de la séquence primaire de la  $\beta$ 4GalT7 par rapport aux six autres membres de la même famille : en effet, le motif (WGWGG/REDDD/E) très conservé dans les  $\beta$ 4GalTs, ne l'est pas dans la  $\beta$ 4GalT7. De plus, les quatre résidus de cystéine classiquement situés à proximité du site catalytique des  $\beta$ 4GalTs sont absents de la séquence de la  $\beta$ 4GalT7. Enfin, la  $\beta$ 4GalT7 possède un seul site de N-glycosylation (Almeida *et al.*, 1999).

### III.3.3.3- Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la $\beta$ 4GalT7 chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*)

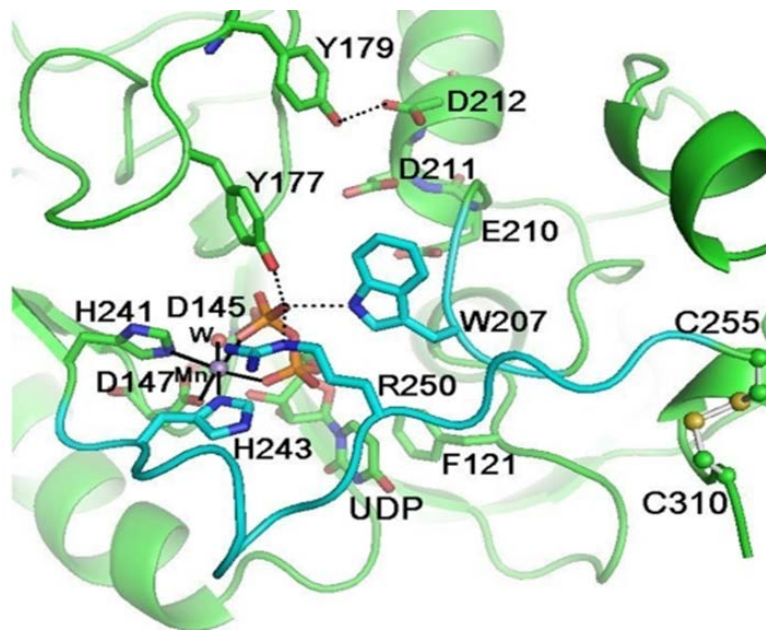
Malgré les importantes études portant sur les GalTs, et plus particulièrement sur la  $\beta$ 4GalT7, la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ 4GalT7 n'a été élucidée qu'en 2010 par Ramakrishnan *et al.*, par cristallisation du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile en présence de  $Mn^{2+}$  et d'UDP (Figure 16).

La structure cristallographique montre un nouveau motif (HXH) de liaison aux  $Mn^{2+}$ , qui n'est pas commun à toutes les GTs. La superposition des structures de la  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile et de la  $\beta$ 4GalT1 bovine a montré des similitudes au niveau du site de liaison du substrat donneur et de la poche catalytique. En revanche, les sites de fixation des substrats accepteurs montrent des différences importantes entre ces deux GalTs.

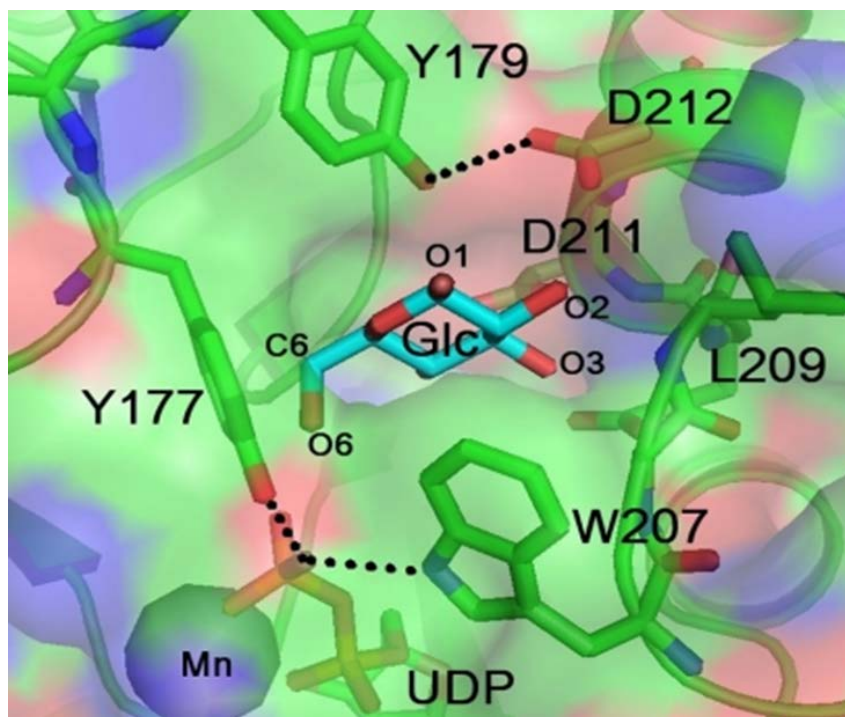
D'autres différences structurales ont aussi été observées entre les deux protéines, notamment au niveau C- et N-terminaux. La  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile possède un peptide C-terminal absent chez la  $\beta$ 4GalT1 bovine, qui, au contraire, présente un peptide N-terminal n'apparaissant pas sur la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile et qui a un rôle important dans l'activité catalytique de l'enzyme.

La modélisation du site de fixation du substrat accepteur montre que la chaîne aromatique latérale du résidu tyrosine en position 177 interagit avec l'atome C5 du xylose, produisant ainsi un encombrement stérique qui empêche toute autre liaison avec un groupement additionnel en C5. Ceci expliquerait la spécificité de la  $\beta$ 4GalT7 pour le xylose comme substrat accepteur. Cette hypothèse est confirmée par la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ 4GalT7 chez la drosophile réalisée en insérant une molécule de glucose dans le site accepteur par modélisation moléculaire (Figure 17). Cette tentative révèle que ce site peut

contenir une molécule de glucose sans le groupement CH<sub>2</sub>OH en C5. Cette modélisation tridimensionnelle a aussi montré que les groupements hydroxyles des atomes O2, O3 et O4 du glucose forment des liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales carboxylates des atomes d'oxygène des résidus aspartate en position 211 et 212 chez la drosophile, correspondants à ceux en position 318 et 319 chez la  $\beta$ 4GalT1 bovine. Ainsi, en se basant sur ses données, nous pourrions prévoir que l'aspartate en position 211 serait la base catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 chez la drosophile (Ramakrishnan *et al.*, 2010).



**Figure 16 : Structure cristallographique du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 de drosophile montrant le site de fixation du manganèse et de l'UDP.** L'ion manganèse (bille gris) forme six liaisons de coordination : deux avec le groupement phosphate de l'UDP (brun), une avec une molécule d'eau, et trois avec les résidus Asp147, His241, His243 du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7. D'après Ramakrishnan *et al.*, 2010.



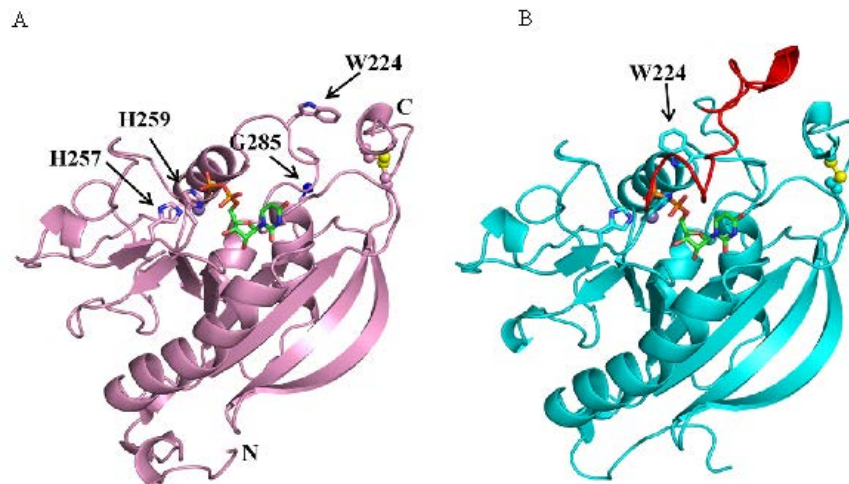
**Figure 17 : Ancrage de la molécule du glucose dans le site accepteur du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 de la drosophile.** Cette structure montre les liaisons hydrogènes observées entre les groupements hydroxyles O2, O3 et O4 du glucose. La chaîne aromatique latérale de la Tyr177 forme un encombrement stérique avec les atomes C6-O6 du glucose, ce qui suggère que seul le xylose est le substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 et non pas le glucose. D'après Ramakrishnan *et al.*, 2010.

#### III.3.3.4- Structure tridimensionnelle de la $\beta$ 4GalT7 humaine

La structure tridimensionnelle de la  $\beta$ 4GalT7 a été élucidée en 2013 par Tsutsui *et al.* Cette enzyme qui appartient à la famille des GTs de type GT-A (Figure 18A et B), présente deux conformations : ouverte ou fermée. Ce changement de conformation se déroule après la fixation du cofacteur métallique  $Mn^{2+}$  et du substrat donneur, l'UDP-Gal (ou à défaut de l'UDP) et implique une petite boucle située entre les résidus <sup>223</sup>Gly-Trp<sup>224</sup> ainsi qu'une grande boucle localisée entre les résidus <sup>259</sup>His-Gly<sup>284</sup>. Le changement de conformation implique la réorganisation des résidus glutamate et aspartate aux positions 227 et 228 respectivement, dans la poche catalytique du fait de la fixation de l'UDP-Gal et du xylose, ce qui serait favorable au bon déroulement de la réaction enzymatique.

Lors de la cristallisation de la  $\beta$ 4GalT7, aucune densité électronique n'a été observée sous la conformation ouverte dans la région 260 à 284 (Figure 18A), tandis qu'une faible densité seulement a été observée entre les résidus 278 à 284. En revanche, sous la conformation fermée, la même région montre une densité électronique nette correspondant à la région où se

situe la grande hélice contenant les résidus 260 à 285 (Figure 18B). Cette apparition de la grande hélice coïncide avec la réorientation de la chaîne latérale du tryptophane en position 224, qui se positionne en face de la poche catalytique de l'enzyme en formant des liaisons hydrogènes avec le pyrophosphate de l'UDP-Gal (Figure 18B).



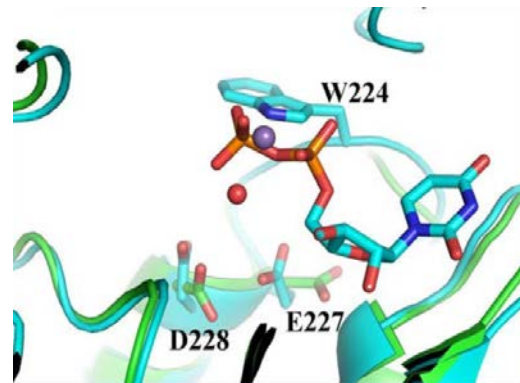
**Figure 18 : Structure cristalline de la  $\beta$ 4GalT7 humaine.** A : conformation ouverte, B : conformation fermée. Un ion de manganèse et une molécule d'UDP sont représentés par une sphère pourpre et des bâtons en vert et orange respectivement. Sous la conformation ouverte (A), une densité électronique est visible au niveau de l'His259 et du Gly285 (sphère bleue). Le motif His257-x-His259, Trp224, et les domaines N et C terminaux sont indiqués. Les ponts disulfures sont indiqués par des bâtons jaunes entre les sphères jaunes représentant les atomes de soufre. Sous la conformation fermée, la grande boucle flexible impliquant les résidus 260-285, invisible dans la représentation de la conformation ouverte, apparaît en rouge. D'après Tsutsui *et al.*, 2013.

En outre, les chaînes latérales des résidus glutamate en position 227 et aspartate en position 228 de la poche catalytique change d'orientation en fonction de la conformation ouverte ou fermée de la  $\beta$ 4GalT7 (Figure 19).

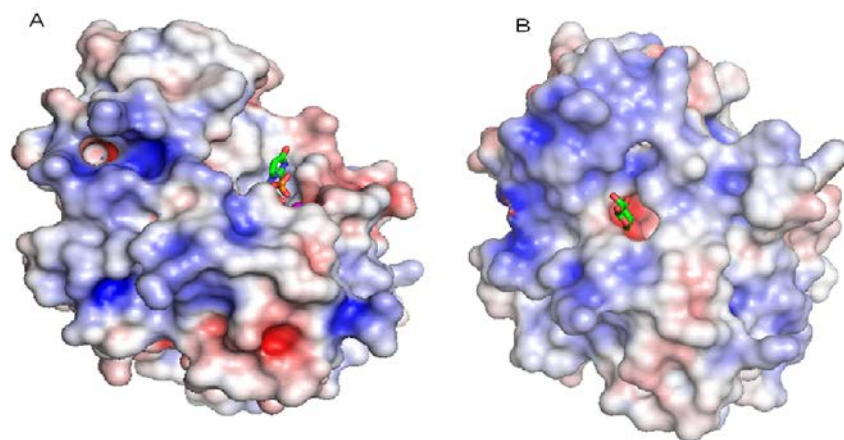
Des liaisons hydrogène sont susceptibles entre le résidu glutamate en position 227 et le galactose de l'UDP-Gal, ainsi que la réorientation de la chaîne latérale de ce résidu en fonction de la conformation de la  $\beta$ 4GalT7 (conformation ouverte ou fermée) est due à la présence de la molécule galactose de l'UDP-Gal. L'aspartate en position 228 est considérée comme base catalytique. Elle attaque l'hydrogène du groupement hydroxyle positionné en C4 du xylose accepteur.

Enfin, le site de fixation du substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 est bordé par trois tyrosines aux positions 194, 196 et 199 et d'un tryptophane en position 224, ce qui lui confère un caractère très hydrophobe et la région autour du xylose est chargée positivement (Figure 20). Cette charge aurait pour rôle de faciliter l'interaction entre l'enzyme et les résidus acides

positionnés entre les répétition Ser-Gly au niveau des sites de fixation du xylose de différents substrats PGs (Esko *et al.*, 1996). Ainsi le changement de la conformation de la protéine ainsi que ses charges auront pour rôle de faciliter les interactions entre la  $\beta$ 4GalT7 l'UDP-Gal et le xylose lié à la protéine *core* des PGs.



**Figure 19 :** Superposition de la structure 3D de la  $\beta$ 4GalT7 humaine sous ses deux conformations ouverte (couleur cyan) et fermée (couleur verte). D'après Tsutsui *et al.*, 2013.



**Figure 20 :** Visualisation du potentiel électrostatique de la  $\beta$ 4GalT7. Les surfaces chargée négativement (en bleu) et positivement (en rouge) sont présentées en fonction de la conformation de la  $\beta$ 4GalT7 ouverte en A et fermée en B. Les batons représentent l'UDP et une modélisation de la molécule de xylose en A et B respectivement. D'après Tsutsui *et al.*, 2013.

### III.3.3.5- La $\beta$ 4GalT7 et le Syndrome d'Ehlers-Danlos

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) est un syndrome regroupant différentes maladies caractérisées par des manifestations cliniques affectant la peau, les articulations et les tendons, les vaisseaux sanguins et parfois certains organes. Du fait de la variabilité du tableau clinique, une estimation de la prévalence ou l'incidence de la maladie est difficile à obtenir, cependant on peut retenir qu'en France, la fréquence atteint environ 1 personne sur 5000 à 10000 (Germain *et al.*, 2007). Afin de donner de la clarté dans le diagnostic du SED, ce dernier a judicieusement été subdivisé en six sous-types en fonction des principales manifestations cliniques dans la classification dite de « Villefranche » (Beighton *et al.*, 1998). Dans cette liste, les six principales sous-catégories du SED ont ainsi été caractérisées de « classique », « hypermobile », « vasculaire », « cyphoscoliosique », « arthro-chalasiqque » et enfin de « dermato-sparaxique » en fonction des critères de diagnostic établis (Beighton *et al.*, 1998). Évidemment, d'autres sous-types de SED, fréquemment moins observés mais ayant été mis en évidence ont été intégrés à cette suite principale. Du point de vue clinique, une atteinte par le SED se traduit généralement par une hyperextensibilité de la peau, une hypermobilité plus ou moins généralisée des articulations et dans certains cas par des vaisseaux apparents et fragiles expliquant la fréquence d'ecchymoses et d'hématomes chez les patients. Dans la plupart des cas, chez les patients pour les lesquels ces signes cliniques sont attribuables au SED, a été constaté, la présence de mutations autosomales dominantes affectant les gènes codant pour l'une ou l'autre des différentes catégories de collagènes fibrillaires mais également pour les enzymes participant à leur biosynthèse ou leur maturation. Ainsi, il a par exemple été montré qu'une mutation induisant un saut d'exon au niveau du gène *COL5A1*, un gène codant pour l'une des chaînes du collagène V était suffisante pour générer des manifestations cliniques correspondant aux types « classique » et « hypermobile » du SED. Les mêmes observations ont été rapportées dans le cas d'une mutation faux sens dans ce même gène et résultant en la substitution d'un résidu cystéine dans la région C-terminale de la pro-protéine par un résidu sérine (Wenstrup *et al.*, 1996 ; De Paepe *et al.*, 1997). Dans d'autres exemples, des mutations affectant le gène *COL1A1*, impliqué dans la synthèse de l'une des chaînes du collagène I sont aussi à l'origine de cas cliniques attribués au SED. Ainsi, une mutation ponctuelle sur le gène à l'origine de la substitution d'un résidu arginine par un résidu cystéine au sein de la séquence d'une des chaînes du collagène I suffit à générer un phénotype SED de type « classique » (Nuytinck *et al.*, 2000), et dans certains cas de type « vasculaire » associé à des ruptures des



parois artérielles (Malfait *et al.*, 2007) bien que ce dernier type ait déjà été associé à des déficiences du gène COL3A1, un gène codant pour une des chaînes du collagène III (Beighton *et al.*, 1998 ; Superti-Furga *et al.*, 1989). De façon intéressante, il a été montré que des manifestations cliniques pouvant être associées au SED pouvaient également être dues à des atteintes portant sur les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la maturation du collagène. Par exemple, une atteinte portant sur le gène *ADAMTS2*, associée à une perte d'activité d'une procollagène-N-protéinase, responsable du clivage du domaine N-terminal des molécules de collagènes I, II et III dans le cadre de leur maturation post-traductionnelle, a été montrée responsable du SED « dermato-sparaxique » associé à une fragilité générale de certains organes et notamment de la vessie (Malfait F *et al.*, 2004). Toutefois, des études ont démontré que des manifestations cliniques pouvant être attribuées au SED pouvaient également être générées par des défauts génétiques affectant la fonctionnalité ou simplement la présence de protéines jouant des rôles clés dans l'architecture de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif. L'exemple le plus connu est celui de la tenascine-X, une protéine importante de la matrice extracellulaire. Des travaux ont en effet montré qu'une déficience de cette protéine était liée à une forme récessive du SED (Schalkwijk *et al.*, 2001). Plusieurs explications ont été proposées à ces observations. Il a été ainsi proposé par exemple qu'une perte de l'activité hydroxylase de la 21-hydroxylase pouvait expliquer une désorganisation de l'architecture de la matrice extracellulaire puisque le gène *TNX* codant la tenascine-X chevauche celui codant la 21-hydroxylase (*CYP21B*) (Burch *et al.*, 1997). Un peu plus tard, il a été indiqué que des mutations affectant le gène *TNX* étaient associées à une altération des fibres élastiques caractéristiques de l'hypermobilité chez les patients atteints de SED et porteurs de ces mutations (Zweers *et al.*, 2005). Clairement, ces observations ont démontré que le syndrome pouvait dans certains cas être associé à d'autres facteurs impliqués notamment dans la bonne structure et/ou l'architecture de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs dont font parties les PGs. Allant dans ce sens, des études réalisées chez la souris ont ainsi montré qu'une mutation nulle affectant le gène codant pour le lumécane résultait en l'opacification de la cornée et une fragilité de la peau rappelant sans ambiguïté des observations cliniques faites pour certains sous-types du SED (Chakravarti *et al.*, 1998). Évidemment, l'expression de la protéine *core* des PGs est importante à considérer dans le syndrome. Toutefois, les étapes de glycosylation de cette dernière doivent également être considérées dans le SED. En effet, les chaînes de GAGs des PGs sont cruciales dans la

fonctionnalité biologique de ces complexes et sont donc capitales dans l'architecture et donc dans la fonctionnalité du tissu conjonctif. C'est ainsi qu'une variante dite « progéroïde » du SED, observée chez des patients présentant un tableau clinique distinct de ceux classiquement connus pour le SED, incluant un défaut de croissance, un retard du développement mental, des anomalies observées dans le tissu dermique et squelettique (Hernandez *et al.*, 1979, 1981 et 1986 ; Kresse *et al.*, 1987), ont été mis en relation directe avec une déficience de l'activité de la galactosyltransférase I (ie  $\beta$ 4GalT7) (Quentin *et al.*, 1990 ; Okajima *et al.* 1999). D'ailleurs, deux mutations affectant significativement l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 ont été mentionnées dès cette période: Arg186Asp et Leu206Pro (Okajima *et al.* 1999 ; Götte *et al.*, 2005). L'implication de l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 dans le SED n'est pas surprenante puisque l'enzyme intervient très tôt dans la biosynthèse des chaînes de GAGs si bien que tout mécanisme altérant son activité impacte directement le niveau de glycosylation des protéines porteuses des PGs. Cette enzyme, jouant un rôle important dans la forme progéroïde du SED, a donc fait l'objet d'études génétiques et enzymatiques plus approfondies. Ainsi, en 2006, Seidler *et al.*, ont mis en évidence une troisième mutation Arg270Cys affectant l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 et responsable du phénotype cellulaire anormal des fibroblastes de peau issus de patients atteints de SED et qui pourrait s'expliquer par un défaut de glycosylation de la décorine et du biglycane (Seidler *et al.*, 2006). Puis, quelques années plus tard, une nouvelle mutation, Leu41Pro, a pu être intégrée à la liste des mutations affectant l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 et associée au SED (Guo *et al.*, 2013). Afin de mieux cerner l'impact des mutations décrites sur la capacité de la  $\beta$ 4GalT7 à initier la biosynthèse des chaînes de GAGs, des essais enzymatiques ont été réalisés au laboratoire. Ainsi, nous avons montré *in vitro* que la substitution Arg270Cys réduisait significativement l'affinité de l'enzyme pour le xyloside accepteur sans modifier lourdement la constante catalytique de l'enzyme (Bui *et al.*, 2010 ; Rahuel-Clermont *et al.*, 2010). De façon très intéressante, nous avons également montré que si *in vitro* le mutant Leu206Pro était capable de réaliser la réaction de transfert du Gal sur le Xyl, *in cellulo*, cette enzyme mutée ne permet plus du tout d'initier la biosynthèse des chaînes de GAGs (Bui *et al.*, 2010 ; Rahuel-Clermont *et al.*, 2010). Enfin, il apparaît que la mutation Arg186Asp affecte significativement l'activité enzymatique aussi bien *in vitro* que *in cellulo* (Bui *et al.*, 2010 ; Rahuel-Clermont *et al.*, 2010). Ensemble, ces résultats permettent de faire le lien entre la baisse de l'activité galactosyltransférase due à ces mutations, la perte de la capacité des cellules à initier la biosynthèse des chaînes de GAGs et les observations cliniques

faites chez les patients atteints du SED. Pour aller plus loin et afin de concevoir des xylosides capables de compenser ces baisses d'activités enzymatiques observées chez les protéines mutées, nous avons entrepris une étude-structure fonction de la  $\beta$ 4GalT7 en essayant de déterminer les résidus d'acides aminés importants, en particulier ceux qui sont impliqués dans l'interaction de l'enzyme avec le substrat xylosidique accepteur (Talhaoui *et al.*, 2011, Saliba *et al.*, 2015). C'est dans ce contexte et au travers d'approches expérimentales complémentaires (mutagenèse dirigée, modélisation moléculaire, tests cellulaires) que nous étudierons plus en détail entre autres le rôle et l'impact du résidu Arg270 sur l'activité enzymatique de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro*, puis *in cellulo* (Saliba *et al.*, 2015).

## Chapitre IV : Modulation des voies de biosynthèse des chaînes de GAGs par des xylosides exogènes

### IV.1 – Historique du développement des composés $\beta$ -D-xylosidiques

Les recherches portant sur les premiers composés  $\beta$ -D-xylosidiques à activités biologiques sont pratiquement contemporaines de celles portant sur les mécanismes biochimiques qui sous-tendent la biosynthèse des GAGs. Ce sont au départ les travaux réalisés par le Dr. Lennart Rodén qui ont été déterminants dans la connaissance de la séquence osidique de la chaîne tétrasaccharidique liant les héparines (Lindahl *et al.*, 1965) et les CS (Lindahl *et al.*, 1965 ; Rodén *et al.*, 1966) aux protéines porteuses des PGs. Très rapidement, des substrats accepteurs exogènes ont été utilisés comme outils dans le but d'étudier les réactions de transfert catalysées par les GTs impliquées dans la biosynthèse des GAGs. Ainsi, l'utilisation de substrats accepteurs tels que le D-xylose, le O- $\beta$ -D-xylosyl-L-sérine, le 4-O- $\beta$ -D-galactosyl-D-xylose ou le 4-O- $\beta$ -D-galactosyl-O- $\beta$ -D-xylosyl-L-sérine ont permis de démontrer que le transfert des deux résidus galactose de la séquence tétrasaccharidique dépend de deux GTs distinctes mais surtout que le D-xylose comme le O- $\beta$ -D-xylosyl-L-sérine pouvaient être pris en charge par la même enzyme *in vitro* (Helting *et al.*, 1969). Ces travaux ont ainsi mis en évidence l'importance biologique des composés xylosidiques de par leur effet initiateur bénéfique sur la biosynthèse des GAGs. La capacité de la  $\beta$ 4GalT7 à prendre en charge les substrats xylosidique exogènes a donc été testée rapidement dans d'autres contextes. Ainsi, il a été ainsi montré par exemple qu'une forte concentration de D-xylose pouvait en partie contourner l'inhibition de la biosynthèse des CS par la puromycine (un antibiotique bactérien) dans le cartilage (Brett *et al.*, 1971). Dans un autre contexte, des auteurs ont montré que si la présence de 5-bromo-2'-deoxyuridine inhibait de façon irréversible la chondrogenèse à partir de cellules souches limbique issue du poulet (Levitt *et al.*, 1972), une addition importante de D-xylose permettait toutefois de rehausser le niveau de synthèse des CS dans les mêmes cellules traitées avec la 5-bromo-2'-deoxyuridine (Levitt D *et al.*, 1973). Dans les deux cas, les auteurs ont montré que l'utilisation de substrat exogènes permettait la synthèse de CS *in cellulo* et *in vivo*, et ce, dans des conditions défavorables pour la biosynthèse de ce type de GAGs. De façon plus importante, des essais enzymatiques portant sur l'effet du *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose sur la biosynthèse des chaînes de GAGs au sein du cartilage embryonnaire de poulet ont montré que ce composé permettait également la

synthèse de CS *in vivo* (Okayama *et al.*, 1973). Ce travail est d'autant plus important qu'il montre pour la première fois qu'un composé xylosidique porteur d'une aglycone hydrophobe de type *p*-nitrophényl- était plus efficace *in vivo* que de le D-xylose seul sans aglycone, ce qui est très certainement lié à une meilleure capacité du composé à pénétrer les membranes cellulaires (Okayama *et al.*, 1973). Du point de vue biologique, il devenait donc intéressant de rechercher des substrats accepteurs xylosidiques capables de générer efficacement des chaînes de GAGs puisqu'il devenait possible de s'affranchir à la fois de la protéine porteuse mais également de l'activité de la xylosyltransférase. Ainsi, de façon très intéressante, des auteurs ont montré que le 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose présentait une efficacité aussi importante que le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose à initier la biosynthèse de chaînes de GAGs dans des cellules souches limbiques traitées avec la 5-bromo-2'-deoxyuridine, des chondrocytes issus du cartilage embryonnaire du poulet traités par la puromycine, des cellules tumorales gliales de rat (RC-6), des cellules issues du neuroblastome de la souris (C1300, NB41A) mais également de cellules issues de lignées cellulaires d'hépatocarcinome de rat (HTC, H(4)) (Schwartz N.B. *et al.*, 1975). Pour ses propriétés spectroscopiques ainsi pour sa grande capacité à initier les chaînes de GAGs, le 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose devenait une référence dans l'étude de la synthèse des GAGs *in cellulo* (Fukunaga *et al.*, 1975 ; Galligani *et al.*, 1975). Il devenait donc évident que la présence d'un groupement aglycone hydrophobe en position 1 du xylose augmentait l'activité biologique du xyloside en lui permettant d'initier la biosynthèse des chaînes de GAGs *in cellulo* plus facilement que ne le ferait un dérivé xylosidique non couplé. Dès lors, certains auteurs ont tenté de substituer l'aglycone 4-Methylumbelliferyl- par des groupements de type acyle ou phényle afin de vérifier leur efficacité sur la biosynthèse des CS dans un modèle cellulaire de cartilage de poulet. Il a été ainsi montré que les xylosides porteurs d'aglycones de type *n*-butyle, *n*-octyle, phényle et benzyle, pouvaient initier la biosynthèse des GAGs *in cellulo* et être substrats de la  $\beta$ 4GalT7 (Robinson *et al.*, 1975 ; Robinson *et al.*, 1981). Sur cette lancée, d'autres équipes ont étendu leurs travaux à plusieurs autres lignées cellulaires, tout en alternant différentes substitutions sur ces  $\beta$ -D-xylosides. Il a été ainsi montré par exemple que les  $\beta$ -D-xylosides porteurs d'une aglycone de type phényle étaient de meilleurs substrats *in vitro* et *in ovo* que ceux porteurs d'une aglycone de type acyle ou benzoïque (Sobue *et al.*, 1987). De façon plus intéressante, les mêmes auteurs ont pour la première fois montré que les  $\beta$ -thioxylosides présentaient un potentiel aussi élevé que les  $\beta$ -D-xylosides classiques (Sobue M. *et al.*, 1987). Une dizaine d'années plus tard, une équipe a

montré d'une manière générale que la substitution des groupements hydroxyles du résidu xylose des  $\beta$ -D-xylosides par des groupements non polaires réduisaient fortement la capacité de ces derniers à initier la biosynthèse des chaînes de GAGs dans les cellule ovariennes issues de hamsters chinois (Lugemwa *et al.*, 1991 et 1996). Si, les approches réalisées durant cette période semblaient empiriques, elles ont toutefois permis de jeter des bases communes à la construction de  $\beta$ -D-xylosides efficacement pris en charge par la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* comme *in vivo*, dans des contextes tissulaires variés incluant le cartilage articulaire et la peau mais également dans un contexte pathologique, afin d'envisager l'utilisation de xylosides modifiés (inhibiteurs de la  $\beta$ 4GalT7) dans le cadre des traitements contre le cancer.

#### **IV.2 – Les composés $\beta$ -D-xylosidiques dans le cadre de la réparation du cartilage articulaire**

Si la recherche de xylosides efficaces dans l'initiation de la synthèse des chaînes de GAGs est bien avancée, la question de la relevance biologique et/ou pharmacologique de ce type de composés est légitime. Puisque les  $\beta$ -D-xylosides étaient connus très tôt pour stimuler la biosynthèse des chaînes de CS *in vitro* et *in vivo*, le premier contexte biologique dans lequel l'intérêt de ces xylosides a été discuté a été celui du tissu cartilagineux. Dans l'exemple du chondrocyte nanométrique mutant incapable de synthétiser des PGs, la présence de  $\beta$ -D-xylosides permettait d'atteindre un niveau de synthèse en CS comparable à celui obtenu avec les chondrocytes sains (Stearns K *et al.*, 1979). Cet effet bénéfique du composé est d'autant plus remarquable que les chaînes synthétisées apparaissaient comparables en taille et en composition osidique à celles produites par les chondrocytes sains (Stearns K *et al.*, 1979). En outre, ces xylosides ne semblent affecter ni le niveau de synthèse du collagène ni sa distribution au sein de la matrice (Dondi P. *et al.*, 1976). Il a d'ailleurs été indiqué que le niveau de glycosylation du collagène IX n'était pas non plus perturbé en présence du *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose (Chandrasekhar *et al.*, 1987). Dans ce sens, les composés  $\beta$ -D-xylosidiques ont été envisagés très tôt comme des agents pouvant potentiellement être employés pour soulager certains cas d'arthrites (Carmichael *et al.*, 1977 ; Palmoski *et al.*, 1982). Cependant, le comportement bénéfique de ces xylosides exogènes vis-à-vis du tissu cartilagineux a dû être rapidement reconsidéré et pondéré. D'une part, parce que de nombreux travaux ont montré que les GAGs synthétisés à partir du 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose étaient plus courts que ceux ancrés sur les protéines porteuses des PGs (Gibson *et al.*, 1977 ;

Gibson et Segen 1977). D'autre part, des travaux plus récents réalisés sur des lignées cellulaires issues du chondrosarcome chez le rat confirment que l'addition de composés  $\beta$ -D-xylosidiques conduit à une diminution significative et généralisée de la glycosylation des PGs endogènes (Mitchell *et al.*, 1982). Enfin, plus récemment, il a été montré qu'un déficit en PGs glycosylés du fait de leur compétition avec les  $\beta$ -D-xylosides pourrait être à l'origine d'une altération de la structure du réseau de collagène empêchant la constitution de la matrice cartilagineuse (Bastiaansen-Jenniskens *et al.*, 2009). Ensemble, ces données suggèrent clairement que si les composés  $\beta$ -D-xylosidiques augmentent la biosynthèse des chaînes de GAGs, en particulier celle des CS dans les chondrocytes, il semble que la qualité de ces derniers ne permet ni l'élaboration, ni la structuration d'une matrice cartilagineuse répondant aux qualités mécaniques requises pour une bonne fonctionnalité du tissu. Toutefois, dans le cadre de la réparation du cartilage, les composés  $\beta$ -D-xylosidiques restent des agents pharmacologiques potentiellement importants pouvant moduler le ratio collagènes/PGs glycosylés, paramètre qui semble être un facteur déterminant de la plasticité bio-mécanique du cartilage (Williams *et al.*, 2011).

#### **IV.3 - Les composés $\beta$ -D-xylosidiques et la régénération/réparation de la peau**

La capacité des  $\beta$ -D-xylosides à synthétiser les chaînes de GAGs a permis très tôt de les envisager comme des agents pouvant potentiellement modifier l'équilibre biochimique et donc biomécanique du tissu dermique. Dans ce sens, les premiers essais réalisés sur des fibroblastes de peau humaine en culture ont montré que le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose augmentait significativement le taux de GAGs solubles synthétisés, tout en réduisant la biosynthèse du collagène (Schwartz *et al.*, 1975). Le point encourageant de cette étude réside dans le fait que cette augmentation de la biosynthèse des GAGs est observable aussi bien dans les fibroblastes sains que dans ceux issus de patients atteints de maladies impactant le tissu conjonctif tels que le sclérodème (Cabral *et al.*, 1983), la maladie de Hurler ou de Marfan (Hopwood *et al.*, 1977), le syndrome de Coffin-Lowry (Beck *et al.*, 1983) ou encore celui de Lowe (Harper *et al.*, 1987). De plus, il est remarquable de constater que la substitution des protéines porteuses des PGs par ces  $\beta$ -D-xylosides semble ne pas affecter le niveau de sulfatation des chaînes de GAGs dans ce contexte (Beck *et al.*, 1983 ; Harper *et al.*, 1987). Si les  $\beta$ -D-xylosides permettent donc sans ambiguïté la biosynthèse en quantité de GAGs correctement sulfatés, il était nécessaire d'un point de vue pharmacologique de déterminer le type de GAGs

majoritairement bio-synthétisés à partir de ces composés afin d'asseoir ces derniers comme agents thérapeutiques/dermatologiques. D'après les premiers travaux, il semble que l'addition de *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose sur des fibroblastes humains en culture contribue essentiellement à la biosynthèse de CS et minoritairement à celles de DS (Hopwood *et al.*, 1977 ; Glössl *et al.*, 1984). Toutefois, il apparaît que la balance CS/DS puisse être régulée par la concentration en *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose utilisée. En effet, pour de faibles concentrations en *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose, les GAGs obtenus sont principalement des DS. Au contraire, pour de fortes concentrations en  $\beta$ -D-xyloside les CS sont le type de GAGs prédominant (Cöster *et al.*, 1991). La même année, d'autres travaux ont montré que la substitution du groupement *p*-nitrophényl- par un groupement 4-Methylumbelliferyl- favorisait la biosynthèse des DS (Takagaki *et al.*, 1991). Ensemble, ces données démontrent que la nature de l'aglycone couplé au composé  $\beta$ -D-xylosidique influence la nature des GAGs bio-synthétisés par les fibroblastes. Actuellement, il n'y a pas d'explication claire permettant de faire un lien direct entre la nature de l'aglycone du  $\beta$ -D-xyloside et l'orientation de la biosynthèse des chaînes de GAGs par les fibroblastes vers les DS ou les CS. Cependant, une analyse poussée portant sur les chaînes de GAGs initiées par le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose a montré qu'aucune substitution n'avait affecté le résidu xylose (Fransson *et al.*, 1992). Au contraire, ce même résidu xylose a été retrouvé 3-O-sulfaté (parmi d'autres fragments xylosidiques déjà identifiés) lorsque les chaînes de GAGs ont été initiées à partir du 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose (Tazawa *et al.*, 1998). Il est donc plausible qu'un mécanisme de régulation fin impliquant des modifications sur le résidu xylose puisse être à l'origine de l'orientation sélective de la biosynthèse des chaînes de GAGs vers celle des DS ou CS et que ce mécanisme dépende de la nature de l'aglycone couplé au  $\beta$ -D-xyloside. Dans des contextes cosmétologique et dermatologique, il aurait été nécessaire que les xylosides proposés permettent également d'initier la biosynthèse des chaînes de HS puisque ces derniers sont impliqués dans les processus de cicatrisation mais également dans les processus de régénération de la peau (Olczyk *et al.*, 2015). Dans cette démarche, plusieurs études ont récemment mis en évidence une nouvelle classe de xylosides capable d'initier la biosynthèse de chaînes de HS dans la peau humaine : les C-xylosides dont le membre à l'honneur est actuellement le C-beta-D-xylopyranoside-2-hydroxy-propane (Pineau *et al.*, 2008 ; Pineau *et al.*, 2011). Les premières études réalisées au sein de la jonction épiderme/derme montraient que l'ajout de C-xyloside serait capable de densifier la membrane basale épidermique, de renforcer la jonction derme/épiderme et de stimuler l'expression du



collagène VII (Sok *et al.*, 2008). Toutefois, les effets bénéfiques avancés concernant ces derniers composés sur la réparation tissulaire doivent être considérés avec précaution à ce stade de la recherche. En effet, des travaux réalisés indépendamment par une autre équipe ont récemment démontré que les chaînes de GAGs initiées par ces mêmes xylosides seraient exclusivement constituées de CS et DS, de tailles plus courtes, et moins sulfatées modifiant par conséquent la capacité de la cellule à interagir avec certains facteurs de croissance par exemple (Vassal-Stermann *et al.*, 2012). Il sera donc nécessaire d'aller plus loin dans la caractérisation biologique de ces C-xylosides.

#### **IV.4 – Les composés $\beta$ -D-xylosidiques et le cancer**

Dans le cadre de nombreux cancers, les GAGs et notamment les HS membranaires jouent des rôles clés au cours des différentes étapes du processus tumoral. Les HS sont généralement positionnés à la surface des cellules mais également au sein de la matrice extracellulaire. Cette position stratégique leur confère souvent un rôle de médiateur-clé dans l'interaction des facteurs de croissance avec leur récepteur. Les HS participent par exemple à l'invasion du tissu sain par les cellules tumorales en favorisant la migration et la division cellulaire (Blackhall *et al.*, 2001 ; Sanderson., 2001), mais également l'angiogenèse (Folkman *et al.*, 1988 ; Klagsbrun., 1992). Parmi les stratégies envisagées il y a quelques décennies, l'une des approches a été de détourner la biosynthèse de PGs à HS (HSPGs) en utilisant des  $\beta$ -D-xylosides. Ainsi, il a été montré par exemple que le N-(*p*-methoxyphenyl)-D-xylopyranosylamine était capable de réduire de 50% le niveau de prolifération cellulaire des cellules B16 issues d'une lignée de mélanome en culture malgré un certain niveau de cytotoxicité (Wang *et al.*, 1983). Dans une autre étude réalisée sur une lignée cellulaire d'hépatocarcinome de rat, il a été montré que l'addition de 1mM de *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose dans le milieu, réduisait le taux de HS nucléaires, ce qui engendrait une réduction de la vitesse de division cellulaire (Ishihara *et al.*, 1989). Toutefois, il semble d'après cette même étude que l'accumulation de HS dans le noyau constitue un signal nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire lorsque le tapis cellulaire arrive à confluence (Ishihara *et al.*, 1989). Dans une autre étude réalisée sur des cellules tumorales potentiellement responsables des métastases au niveau du foie, il a été montré que le  $\beta$ -D-xyloside renforçait l'adhésion cellulaire mais également la prolifération cellulaire (Tímár *et al.*, 1995). Ainsi, l'effet anti-tumoral des  $\beta$ -D-xylosides n'est pas clairement établi. Ceci dit, il semble tout de même que l'inhibition de la biosynthèse des

HSPGs reste dans les faits une bonne approche contre la progression des processus tumoraux. Par exemple, il a été démontré au sein d'une lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif (MB MDA 231) que la présence de  $\beta$ -D-xylosides inhibait l'interaction des cellules avec la thrombospondine, une glycoprotéine capable de promouvoir l'adhésion des cellules cancéreuses avec les cellules endothéliales vasculaires *via* les HSPGs (Incardona *et al.*, 1996). Dès lors, la recherche des xylosides à activités anti-tumorales s'est orientée vers la proposition de composés capables de s'opposer efficacement à la glycosylation des PGs. De façon très constructive une équipe a ainsi proposé une 2(6-hydroxynaphthyl)- $\beta$ -D-xylopyranoside capable d'inhiber sélectivement la croissance de cellules tumorales ou des cellules transfectées par un antigène viral (SV-40) (Mani *et al.*, 1998). L'approche est judicieuse car le xyloside proposé reprend les bases structurales des meilleurs substrats xylosidiques incluant notamment une aglycone bi-aromatique porteur d'un groupement hydroxyle capable de contracter d'éventuelles liaisons hydrogènes lors de son interaction avec la  $\beta$ 4GalT7. La supériorité de ce composé vis-à-vis du 2-naphthyl- $\beta$ -D-xylopyranoside ou encore du *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylose en terme d'inhibition de la glycosylation des PGs (HS et CS confondus) a d'ailleurs été vérifié *in vitro* et *in vivo* (Mani *et al.*, 1998 et 2004). En outre, cette même équipe montre quelques années plus tard qu'un des mécanismes du caractère anti-tumoral du 2(6-hydroxynaphthyl)- $\beta$ -D-xylopyranoside tiendrait de l'accumulation de GAGs libres, non liées à des PGs, qui sont ensuite clivés sous forme de produits à chaînes courtes par le NO puis accumulés dans le noyau (Mani *et al.*, 2004). Ce mécanisme n'est pas sans rappeler l'impact de l'accumulation des chaînes de HS dans le noyau sur la division cellulaire évoqué par Ishihara M. en 1989. Il est toutefois à noter que ces composés pourraient en parallèle provoquer l'apoptose des cellules comme cela a été montré pour la lignée cellulaire humaine T24 issue d'une tumeur de la vessie (Jacobsson *et al.*, 2006). Dans tous les cas, l'ensemble de ces travaux ont positionné le 2(6-hydroxynaphthyl)- $\beta$ -D-xylopyranoside comme le précurseur d'une véritable famille de  $\beta$ -D-xylosides aux propriétés anti-tumorales, qui sera complétée plus tard par le développement de la chimie dite «CLICK». Ainsi, une série de nouveaux composés  $\beta$ -D-xylosidiques ayant pour construction un résidu xylose rattaché à une aglycone hydrophobe aromatique et porteur d'un groupement hydrophile ont depuis été testés avec succès par exemple sur des cellules issues de tumeurs gliales (Raman *et al.*, 2010). Dans une approche complémentaire, des inhibiteurs ciblant spécifiquement la  $\beta$ 4GalT7 ont également été générés sur des bases moléculaires comparables mais en substituant cette fois le

groupement hydroxyl- en C4 par un fluor rendant impossible toute réaction de transfert (Raman *et al.*, 2011 ; Tsuzuki *et al.*, 2010). De façon prometteur, ces composés semblent atténuer l'angiogenèse associée au processus tumoral (Raman *et al.*, 2011 ; Kalita *et al.*, 2015). Sur cette progression, il faudra certainement compter dans l'avenir sur les composés  $\beta$ -D-xylosidiques parmi les molécules aux potentialités anti-tumorales.

#### **IV.5 – Bilan de l'utilisation de dérivés xylosidiques**

Jusqu'au milieu des années 90, la recherche des composés  $\beta$ -D-xylosidiques était essentiellement orientée sur la proposition de composés pouvant initier la biosynthèse de chaînes de GAGs *in cellulo*. Les approches, empiriques, ont tout de même permis de dégager une construction moléculaire commune (xylose+aglycone hydrophobe aromatique) à considérer dans la synthèse de  $\beta$ -D-xylosides portant une activité biologique au niveau cellulaire. Cette base moléculaire a permis le développement de nombreux  $\beta$ -D-xylosides originaux façonnés à travers l'évolution des connaissances concernant l'impact des GAGs et de leur métabolisme sur l'homéostasie tissulaire. D'ailleurs, la prise de conscience du potentiel pharmacologique et/ou thérapeutique de ce type composé a été un premier point essentiel dans l'affinement progressif de cette recherche. En effet, les chercheurs se sont évertués à considérer les interactions possibles de leur produit de synthèse avec la  $\beta$ 4GalT7 dans le design de leurs molécules. Par exemple, dès 1996, Lugemwa *et al.* indiquaient clairement que les positions C2 et C3 du xylose ne devraient être substitués que par des groupements polaires car ils participeraient à des liaisons hydrogènes avec l'enzyme (Lugemwa *et al.*, 1996). Un peu plus tard, Gulberti *et al.*, en 2005 ont montré que la phosphorylation du xylose en position C2 était un événement inhibant la biosynthèse des chaînes de GAGs suggérant que ce processus était possiblement un facteur de régulation de la biosynthèse des chaînes de GAGs (Gulberti *et al.*, 2005). Un peu plus tôt, il a été montré que si le 3-oestradiol- $\beta$ -D-xyloside permettait la synthèse de chaînes de HS (Lugemwa, *et al.*, 1991), la substitution du 3-oestradiol par des groupements dérivés du naphthol générait des  $\beta$ -D-xylosides efficaces pour initier ces GAGs (Fritz *et al.*, 1994). La présence d'un groupement hydroxyle sur l'aglycone aromatique semble donc importante dans la prise en charge du composé par la  $\beta$ 4GalT7. C'est sur cette base qu'en 2007, Johnsson *et al.*, ont proposé des composés bi-xylosidiques capables d'initier la biosynthèse des chaînes de GAGs (Johnsson *et al.*, 2007), et qu'en 2008 que l'équipe de Kuberan *et al.* systématisait la recherche des meilleures aglycones aromatiques en

employant la méthode « CLICK ». Ces résultats ont ainsi permis la génération d'une série de composés  $\beta$ -D-xylosidiques originaux ayant fait leur preuve au sein de cellules de mammifères (Kuberan *et al.*, 2008), mais également dans l'étude du développement du poisson-zèbre (Nguyen *et al.*, 2013). Dans l'histoire du développement des  $\beta$ -D-xylosides, un second fait marquant a été celui de l'étude structurale du site de fixation du substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 exprimée chez la Drosophile et l'Homme suite à sa cristallisation (Ramakrishnan *et al.*, 2010 ; Tsutsui *et al.* 2013). Ces études ont en effet permis de mettre en évidence les différents résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction de l'enzyme avec les  $\beta$ -D-xylosides et surtout de comprendre le comportement substrat ou inhibiteur *a posteriori* de certains composés testés lors des essais *in vitro* et *in cellulo*. Depuis, les stratégies adoptées dans le design de ces molécules ont largement été améliorées. En effet, les travaux réalisés ces dernières années ont tenu compte: i) de la nécessité de maintenir un maximum de liaisons hydrogènes entre le substrat (ou l'inhibiteur) proposé avec les résidus de l'enzyme en choisissant des substituants polaires pour le résidu xylose et en préférant des aglycones aromatiques porteuses de groupements polaires (Siegbahn *et al.*, 2015), ii) des configurations de la partie sucrée du xyloside en fonction de la polarité de l'environnement mais également en fonction de ses substituants (Siegbahn *et al.*, 2014 ; Rønnols *et al.*, 2013). Nos travaux s'inscrivent pleinement dans la continuité de ces acquis. Nous visons en effet la recherche de xylosides à activité antiproliférative en poursuivant l'exploration structurale et fonctionnelle de la  $\beta$ 4GalT7. Puis, en nous appuyant sur ces informations ainsi que sur celles concernant les structures et constructions des xylosides inhibiteurs, nous proposerons une petite série de composés  $\beta$ -D-xylosidiques capables d'inhiber efficacement la biosynthèse des chaînes de GAGs *in vitro* et *in cellulo* à l'instar de certains composés présentés précédemment (Garud *et al.*, 2008 ; Nilsson *et al.*, 2009 et 2010 ; Tsuzuki *et al.*, 2010 ; Siegbahn *et al.*, 2014 et 2015). Ainsi, nous espérons proposer des composés  $\beta$ -D-xylosidiques inhibiteurs présentant une affinité remarquable pour la  $\beta$ 4GalT7 et pouvant dans le meilleur des cas être proposés comme des candidats précurseurs d'une famille d'anti-tumoraux potentiels.

# *Présentation de l'étude*

Les chaînes de GAG sont des chaînes linéaires constituées par la répétition d'unités disaccharidiques composées alternativement d'une hexosamine (GalNAc, GlcNAc ou GlcNAc déacétylée/N-sulfatée) et d'un acide uronique (GlcA ou IdA). Ces chaînes de GAGs sont liées de façon covalente à différentes protéines porteuses pour former les PGs qui seront ensuite ancrés à la membrane plasmique des cellules ou exportés vers la matrice extracellulaire. Cette double nature biochimique des PGs permet de rassembler au sein d'une même macromolécule une très importante variabilité structurale et fonctionnelle. Cette propriété est à la base de la très grande capacité interactive de ces composés vis-à-vis d'autres constituants matriciels, des composants cellulaires ou encore de médiateurs solubles. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières et de leur localisation stratégique à l'interface cellules-matrice extracellulaire, les PGs jouent des rôles structuraux et fonctionnels clés dans de multiples processus cellulaires physiologiques mais aussi pathologiques (Kreuger et al., 2006). En effet, une dérégulation de la quantité et/ou de la qualité des chaînes de GAGs biosynthétisées est associée à diverses pathologies, comme l'arthrose (Vynios *et al*, 2014), les maladies neurodégénératives (Cui *et al*, 2013) ou encore le cancer (Theocharis *et al*, 2015). Il est donc nécessaire de comprendre l'impact de la perturbation de la balance synthèse/dégradation des chaînes de GAGs des PGs sur la perte d'homéostasie cellulaire et tissulaire, afin de chercher à la corriger dans un contexte thérapeutique. Dans ce sens, il est important d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de l'assemblage de ces chaînes glycaniques en particulier, les étapes précoces de ce processus.

La biosynthèse des chaînes de GAGs est initiée par la formation d'une séquence tétrasaccharidique GlcA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl- commune à la plupart des types de chaînes de GAGs, attachée au niveau d'un résidu sérine d'une protéine porteuse. Cette séquence tétrasaccharidique va ensuite servir d'amorce pour la biosynthèse des chaînes de GAGs (HS/HP ou CS/DS) par polymérisation séquentielle des unités disaccharidiques grâce aux glycosyltransférases de la famille des CSS pour les CS/DS et celles de la famille des EXT pour les HS/HP comme nous l'avons précédemment décrit dans la partie « II. Glycosaminoglycanes ».

Parmi les glycosyltransférases impliquées dans ce processus de biosynthèse, la  $\beta$ 4GalT7 est une enzyme-clé de l'étape d'initiation dans la mesure où elle est responsable du transfert du deuxième résidu (galactose) sur la protéine porteuse xylosylée. (Nakamura et al., 2002 ; Takemae et al., 2003). De plus, elle apparaît comme une cible thérapeutique particulièrement

intéressante en raison de sa capacité à utiliser des effecteurs xylosidiques exogènes capables d'initier ou d'inhiber la formation des différents types de chaînes de GAGs *in vitro* mais également *in cellulo* (Talhaoui et al., 2010). C'est dans ce contexte que la  $\beta$ 4GalT7 fait l'objet depuis quelques années, d'une étude structure-fonction approfondie par notre équipe (Bui *et al*, 2010 ; Talhaoui et al., 2010 ; Rahuel-Clermont *et al*, 2010) . La structure cristallographique de la  $\beta$ 4GalT7 humaine soluble mutée D211N et délétée de 28 (53 à 80) acides aminés codant la partie N-terminale de la region stem a été récemment résolue par Tsutsui *et al* (2013). Cependant, les déterminants moléculaires de la reconnaissance du substrat accepteur ainsi que son mécanisme catalytique restent mal connus. Il semble donc important de déterminer les résidus d'acides aminés qui gouvernent l'organisation du site actif de la  $\beta$ 4GalT7 et ceux qui sont responsable de la reconnaissance spécifique du substrat accepteur (la protéine porteuse xylosylée ou des xylosides synthétiques). L'un des objectifs finaux de ce genre d'études étant de parvenir à moduler la biosynthèse des GAGs grâce à des molécules exogènes spécifiquement dirigées contre la  $\beta$ 4GalT7. En fonction de leur action (initiatrice ou inhibitrice) sur l'initiation de la biosynthèse des GAGs, ces molécules effectrices pourront être utilisées dans un but thérapeutique, respectivement pour activer ou inhiber la biosynthèse des GAGs dans un contexte pathologique (Saliba *et al*, 2015).

Dans ce contexte, j'ai initié ma thèse par une étude structure/fonction du site actif de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine en m'appuyant (1) sur un modèle bioinformatique ciblant le site de fixation du substrat accepteur établi par le CERMAV-CNRS UPR 5301 à Grenoble et (2) sur une comparaison des alignements de séquences protéiques de la  $\beta$ 4GalT7 de différentes espèces, afin de mettre en évidence les acides aminés (conservés) susceptibles d'interagir avec le substrat accepteur.

Ces acides aminés identifiés ont ensuite été systématiquement substitués de façon conservative ou non par mutagenèse dirigée. Puis, l'activité enzymatique de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine soluble (délétée de ses 60 premiers acides aminés en fusion avec la GST) produite dans les bactéries a été mesurée par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC), afin de vérifier le rôle et l'impact des résidus modifiés sur l'activité enzymatique *in vitro*. L'impact de ces mutations sur la capacité de la  $\beta$ 4GalT7 à initier la synthèse des chaînes de GAG ou à glycosyler une protéine porteuse modèle (ici, la décorine) *in cellulo* a été vérifiée de façon complémentaire.

Dans la deuxième partie de ma thèse, réalisée en collaboration avec l'ICOA-UMR7311

(Orléans) et le CERMAV- CNRS UPR 5301 (Grenoble), nous avons proposé et testé des molécules xylosidiques susceptibles d'inhiber l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* et donc de moduler la biosynthèse des GAGs *in cellulo*. Nous avons étudié l'effet inhibiteur de ses molécules xylosidiques modifiées par des tests d'inhibition enzymatique *in vitro* et des mesures d'inhibition de la biosynthèse des GAGs *in cellulo*. Nous avons en parallèle analysé leur effet antiprolifératif et cytotoxique sur les cellules déficientes en  $\beta$ 4GalT7 (les cellules de la lignée CHO pgsB618) surexprimant la forme sauvage de l'enzyme et sur deux lignées cancéreuses humaines (une lignée issue d'un chondrosarcome, SW-1353 et une lignée cancéreuse mammaire, MDA MB-231).

Nous attendons de ces travaux (1) une meilleure compréhension du rôle de la  $\beta$ 4GalT7 dans les étapes d'initiation de la biosynthèse des GAGs, (2) l'identification des déterminants moléculaires régissant sa spécificité de substrats, (3) la résolution du mécanisme catalytique conduisant au transfert du résidu galactose sur la protéine porteuse xylosylée, (4) le développement de molécules glucidiques bioactives modulatrices de la biosynthèse des GAGs.



# *Matériels et Méthodes*

## Chapitre I : Les matériels

### I.1- Les réactifs chimiques et biochimiques

Le 4-Méthylombelliféryl- $\beta$ -D-xylopyranoside (4-MOX), l'Uridine 5'-diphosphogalactose disodium salt (UDP-Gal), l'isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG), la généticine (G418), l'ampicilline, la Kanamycine, la benzonase, le milieu *Luria Bertani* (LB), le tween 20, et l'anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase ont été fournis par Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Le Méthylombelliféryl-4-fluoro- $\beta$ -D-xylopyranoside (4F-xyl-MU), le Méthylombelliféryl-4-hydroxy- $\beta$ -D-xylopyranoside (4H-xyl-MU) et le Naphtyl-4-hydroxy- $\beta$ -D-xylopyranoside (4H-xyl-naphtyl) ont été synthétisés et fournis par l'équipe du Dr. Jean-Claude Jaquinet et du Dr Chrystel Lopin-Bon (UMR7311-CNRS, Institut de Chimie Organique et Analytique –ICOA, Orléans). L'anticorps monoclonal anti-myc a été fourni par Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'anticorps monoclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxydase a été fourni par Cell Signaling (Saint Quentin Yvelines, France) tandis que l'anticorps polyclonal anti-décorine provient de chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Le  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  était fourni par Perkin Elmer Life Sciences (Courtabœuf, France). La résine Sephadex G50 fine, les colonnes Sepharose Glutathion haute performance ainsi que les films Hyperfilm MP proviennent d'Amersham Biosciences (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Enfin, les gels gradient 4-20% Criterion™ TGXTM proviennent de Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Les inhibiteurs de protéases (*Complete EDTA-free proteases inhibitor*) sont fournis par Roche Life Sciences (Meylan Cedex, France), l'Exgen 500 et l'albumine sérique bovine (*BSA, Bovin Serum Albumin*) par Euromedex (Souffelweyersheim, France). Le kit d'évaluation de la prolifération cellulaire (*CellTrace CFSE Cell Proliferation kit*) provient de Life-technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### I.2- Les lignées cellulaires et les milieux utilisés en culture cellulaire

Les cellules CHO-pgsB618 (cellules d'ovaire de hamster chinois, déficientes en  $\beta$ 4GalT7, CRL-2241), les SW-1353 (cellules de chondrosarcome humain, HTB-94™) et les MDA-MB-231 (cellules cancéreuses humaines glande mammaire, HTB-26™) ont été obtenues auprès de la banque « *American Type Culture Collection* » (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). Les milieux de culture cellulaire DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*),

DMEM/F12 (1 :1), Fisher, la glutamine, la pénicilline/streptomycine, et le SVF (sérum de veau fœtal) proviennent de GIBCO-Life Technologies (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

### **I.3-Les réactifs de biologie moléculaire**

Les enzymes de restriction ainsi que l'ADN ligase T4 proviennent de New England Biolabs (NEB, Hitchin, Grande-Bretagne). Le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1a (+) ainsi que les bactéries compétentes One Shot Top 10 (*E. coli*), ont été fournis par Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le vecteur d'expression bactérien pET-41a (+) ainsi que les bactéries *Escherichia. coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) proviennent de Novagen-EMD Biosciences (Nottingham, Grande-Bretagne). Le kit de mutagenèse dirigée « *QuikChange site-directed mutagenesis kit* » est un produit de Stratagene (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Le kit d'extraction d'ADN plasmidique provient de Qiagen (Courtabœuf, France).

## Chapitre II : Méthodes expérimentales

### II.1- Clonage de la $\beta$ 4GalT7 et construction des vecteurs d'expression

Le vecteur recombinant pET-  $\beta$ 4GalT7 exprimant le domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 délété de ses 60 acides aminés N-terminaux ainsi que les vecteurs d'expression recombinants pcDNA-  $\beta$ 4GalT7 et pcDNA-décorine ont été construits au laboratoire comme décrit précédemment (Talhoui 2010).

Les séquences codantes pour la  $\beta$ 4GalT7 et la décorine humaines obtenues partir d'une banque d'ADNc de placenta (Clontech, Palo Alto, CA, USA), ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

#### ***Pour la $\beta$ 4GalT7 :***

Amorce sens : 5' CAGGTACCATGTTCCCCTCG 3'

Amorce antisens :

5'CTCTAGCTACAGATCCTCTTCAGAGATGATTTCTGCTCGCTGAATGTG 3'

#### ***Pour la décorine humaine :***

Amorce sens : 5' ATGAAGGCCACTATCATCCTCCTTCTG 3'

Amorce antisens : 5' CTACTIONTATAGTTTCCGAGTTGAATGGC 3'

Le programme de PCR pour un cycle est résumé dans le tableau 2 suivant :

Température (°C)	Temps
95	2 minutes
95	45 secondes
60	50 secondes
68	10 minutes
68	7 minutes

**Tableau 2 : Séquence utilisée dans le cadre de la programmation d'un cycle PCR.** Ce cycle est répété 25 fois.

L'ADNc obtenu pour la  $\beta$ 4GalT7, a été cloné dans le vecteur PCR2.1 TOPO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) comme décrit précédemment (Gulberti *et al.*, 2005). La construction PCR2.1-  $\beta$ 4GalT7 sera utilisée pour construire les différents vecteurs d'expression.

L'ADNc de la décorine a été cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3.1a(+) (pcDNA-décorine), et sera utilisé pour exprimer la protéine porteuse de la décorine dans les cellules eucaryotes.

### **II.1.1- Construction du vecteur d'expression pcDNA- $\beta$ 4GalT7**

Le vecteur de clonage PCR2.1-  $\beta$ 4GalT7 a été modifié par PCR pour introduire en 5' de l'amorce sens, un site *KpnI* et une séquence Kozak d'optimisation de la traduction ; et en 3' de l'amorce antisens, un site *XbaI* et une séquence codant l'étiquette « Myc » (EQKLISEEDL). Le produit de la PCR est ensuite cloné dans les sites *ad hoc* du vecteur pcDNA3.1a(+) portant le gène de résistance à l'ampicilline pour obtenir le vecteur d'expression pcDNA-  $\beta$ 4GalT7..

### **II.1.2- Construction du vecteur d'expression pET- $\beta$ 4GalT7**

L'ADNc codant la forme délétée des 60 acides aminés N-terminaux de la  $\beta$ 4GalT7 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces permettant l'introduction d'un site de restriction *NcoI* en 5' et un site *XhoI* en 3'. Le produit de la PCR est ensuite sous-cloné dans le vecteur d'expression pET-41a(+) en fusion avec le gène codant pour la Glutathion-S-Transférase (GST). Les deux partenaires de fusion sont séparés par un site de clivage à l'entérokinase. La construction pET-  $\beta$ 4GalT7 qui sera utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* BL21 (DE3), afin d'exprimer la forme soluble de l'enzyme dans les bactéries et purifier la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée. La  $\beta$ 4GalT7 sauvage sera produite sous deux formes : soit fusionnée à la GST (GST-  $\beta$ 4GalT7) ou non fusionnée après clivage du partenaire de fusion par l'entérokinase ( $\beta$ 4GalT7).

## **II.2- Mutagenèse dirigée**

La mutagenèse dirigée permet de remplacer ou déléter un ou plusieurs acides aminés dans une protéine. Dans cette étude, nous remplacerons des acides aminés susceptibles d'être impliqués dans l'organisation du site de fixation du substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine. Ces acides aminés seront mutés de façon conservative ou non conservative afin d'étudier leur rôle fonctionnel ou structural le cas échéant.

Les vecteurs recombinants pET- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ -60 et pcDNA- $\beta$ 4GalT7 ont été utilisés comme matrice pour les réactions de PCR en utilisant des amorces sens et anti sens portant le codon contenant la mutation d'intérêt (Tableau 3). Les acides aminés (Y194, H195, Y196, Y199,

R226 et R270) seront substitués de façon conservative et non conservative par la technique de mutagenèse dirigée en utilisant le kit « *QuickChange site-directed mutagenesis kit* » (Stratagene, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Pour ce faire, 50ng d'ADN plasmidique sont mélangés avec 125ng de chaque amorce nucléotidique, 10mM de dNTP, 2U de l'ADN polymérase pfu Turbo dans un volume final de 50  $\mu$ L. Le cycle de PCR utilisé est le suivant : 95 °C pendant 30 secondes, 95 °C pendant 1 minute, 58 °C pendant 1 minute et 68 °C pendant 10 minutes. Ce cycle a été répété 20 fois. A la fin de la PCR, nous ajoutons l'enzyme de restriction Dpn1 (incubation 3h à 37°C) afin de cliver de façon spécifique l'ADN plasmidique matrice méthylé, permettant ainsi de sélectionner l'ADN muté (non méthylé). Le produit de la réaction de PCR sera ensuite inséré dans des bactéries *E. coli* (TOP 10) après transformation par choc thermique pour y être amplifié.

Mutant	Amorces	Séquences nucléotidiques
Y194A	Sens	5'CTCCACCCTCTC <u>GCC</u> CACTACAAGACC3'
Y194A	Antisens	5'GGTCTTGTAGTG <u>GGC</u> GAGAGGGTGGAG3'
Y194F	Sens	5'CTCCACCCTCTCT <u>TTC</u> CACTACAAGACC3'
Y194F	Antisens	5'GGTCTTGTAGTG <u>GAA</u> GAGAGGGTGGAG3'
Y196A	Sens	5'CCCTCTCTACCA <u>CGC</u> CAAGACCTATGTGC3'
Y196A	Antisens	5'CGACATAGGTCTT <u>GGC</u> GTGGTAGAGAGGG3'
Y196F	Sens	5'CCCTCTCTACCA <u>CTT</u> CAAGACCTATGTGC3'
Y196F	Antisens	5'CGACATAGGTCTT <u>GAA</u> GTGGTAGAGAGGG3'
Y199A	Sens	5'CCACTACAAGACC <u>GCT</u> GTGCGGCGGCATCC3'
Y199A	Antisens	5'GGATGCCCGCCGAC <u>AGC</u> GGTCTTGTAGTGG3'
Y199F	Sens	5'CACTACAAGACC <u>TTC</u> GTCGGCGGCATCC3'
Y199F	Antisens	5'GATGCCCGCCGAC <u>GAA</u> GGTCTTGTAGTGG3'
H195A	Sens	5'CCACCCTCTCTAC <u>GC</u> CTACAAGACCTATG3'
H195A	Antisens	5'CATAGGTCTTGTAG <u>GGC</u> GTAGAGAGGGTGG3'
H195Q	Sens	5'CCACCCTCTCTAC <u>CAG</u> TACAAGACCTATG3'
H195Q	Antisens	5'CATAGGTCTTGTAC <u>CTG</u> GTAGAGAGGGTGG3'
H195R	Sens	5'CCACCCTCTCTAC <u>CG</u> CTACAAGACCTATG3'
H195R	Antisens	5'CATAGGTCTTGTAG <u>GCG</u> GTAGAGAGGGTGG3'
R226A	Sens	5'TGGGGCTGGGGC <u>GCC</u> GAGGACGACGAG3'
R226A	Antisens	5'CTCGTCGTCTC <u>GGC</u> GCCCCAGCCCCA3'
R226K	Sens	5'TGGGGCTGGGGC <u>AAG</u> GAGGACGACGAG3'
R226K	Antisens	5'CTCGTCGTCTC <u>CTT</u> GCCCCAGCCCCA3'
R270A	Sens	5'AGGGACCAGAAG <u>GCC</u> ATCGCAGCTCAA3'
R270A	Antisens	5'TTGAGCTGCGAT <u>GGC</u> TTCTGGTCCCT3'
R270K	Sens	5'AGGGACCAGAAG <u>AAG</u> ATCGCAGCTCAA3'
R270K	Antisens	5'TTGAGCTGCGAT <u>CTT</u> CTTCTGGTCCCT3'

**Tableau 3 : Séquences sens et antisens des amorces nucléotidiques utilisées pour réaliser la mutagenèse dirigée**

### II.3- Amplification et extraction d'ADN plasmidiques

Les bactéries (*E. coli* One Shot® Top 10) sont transformées par les vecteurs pET-  $\beta$ 4GalT7 ou pcDNA-  $\beta$ 4GalT7 par choc thermique. La réaction de transformation consiste à incuber une suspension contenant 25  $\mu$ L de bactéries compétentes avec 1 $\mu$ g de plasmide pendant 15 minutes sur glace, suivi par un choc thermique réalisé en incubant la suspension bactérienne

45 secondes à 42°C puis rapidement refroidie 3 minutes sur glace. Les bactéries transformées sont ensuite mises en culture durant 12 heures à 37 °C sous agitation à 200 x g dans 50 mL de milieu LB supplémenté de 50 µg/mL de Kanamycine pour les bactéries ayant intégré le vecteur pcDNA 3.1 ou d'Ampicilline pour les bactéries transformées avec le vecteur pET 41a (+). La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 6000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot est re-suspendu dans 4 mL du tampon P1 (tampon de suspension : 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 10 mM EDTA ; 100 µg/ml RNase A), et incubé 5 minutes à température ambiante après l'ajout de 4 mL du tampon P2 (tampon de lyse : 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)). Ensuite 4 mL du tampon P3 (tampon neutralisant la lyse : 3 M acétate de potassium, pH 5,5) sont ajoutés. Après une incubation de 15 minutes sur glace suivi d'une centrifugation à 14000 x g pendant 50 minutes à 4 °C, le surnageant est récupéré et déposé sur une colonne QIAGEN-tip 100 préalablement équilibrée par 4 mL de tampon QBT (tampon d'équilibration : 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)). Après dépôt du surnageant, la colonne sur laquelle s'est fixé l'ADN plasmidique est lavée avec 2 fois par 10 mL de tampon QC (tampon de lavage : 1 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7,0 ; 15% isopropanol (v/v)). L'ADN plasmidique est ensuite élué à l'aide de 4 mL de tampon QF (tampon d'éluion : 1,25 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7,0 ; 15% isopropanol (v/v)). 3,2 mL d'isopropanol sont ajoutés à l'éluât afin de précipiter l'ADN. Le mélange est ensuite centrifugé à 15000 x g pendant 30 min à 4 °C. Le culot d'ADN est lavé avec 2 mL d'éthanol à 70 %, centrifugé 10 min à 15000 x g, et séché pendant 10 minutes sous vide. Les ADN plasmidiques recueillis seront dissous dans 50 µL d'eau ultra-pure sans nucléases puis utilisés comme suit :

- 1- Les plasmides pET-β4GalT7 pour la transformation des bactéries *E. coli* BL21 en vue de l'expression et de la purification de la protéine soluble GST-β4GalT7ΔNt-60.
- 2- Les plasmides pcDNA-β4GalT7 pour l'expression de l'enzyme dans les cellules eucaryotes.

Les séquences nucléotidiques sont systématiquement vérifiées par séquençage auprès de *Beckman Coulter Genomics* (Grande Bretagne) et sont homologues aux séquences attendues pour l'enzyme sauvage et ses mutants.



#### **II.4- Expression et purification de la $\beta$ 4GalT7 sous forme soluble dans les bactéries *E. coli* BL21**

Les bactéries *E. coli* BL21 sont transformées par le vecteur pET41-GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 (ou l'un des vecteurs recombinants codant pour l'un des mutants de la  $\beta$ 4GalT7) et mises en pré-culture à 37°C dans 3 mL de milieu *Luria-Bertani* (LB) en présence de Kanamycine (50  $\mu$ g/mL). Après 24 h, 1 mL de la pré-culture est utilisé pour ensemercer 200 mL de milieu LB-kanamycine, à 37°C sous agitation à 200rpm. Après 3 h d'incubation, la DO à 600nm est mesurée toutes les 10 min. Lorsque la valeur de DO atteint 0.6-0.8 unités, nous réservons 100 $\mu$ L du milieu de culture dans un tube eppendorf qui seront déposés sur gel (échantillon non induit), puis nous induisons l'expression de notre protéine en ajoutant l'Isopropyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) (1mM) dans le milieu de culture, qui est ensuite incubé environ 18h à 20°C sous agitation à 200rpm. La suspension bactérienne est alors centrifugée à 5000 x g pendant 10 min afin de récupérer les culots bactériens qui seront lavés deux fois avec un tampon de lavage contenant 50mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM phenylmethylsulfofluoride et 5% (v/v)glycérol. Les culots sont ensuite repris dans 8mL de ce même tampon complété d'inhibiteurs de protéases (*Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche Life Sciences) auxquels sont également ajoutés de la benzonase à 250U/mL afin de dégrader tous les acides nucléiques. La suspension est soumise à une sonication 8 x 30 secondes en incubant alternativement 30 secondes sur glace entre chaque sonication (Sonicateur Bandelin Sonoplus GM70, puissance : 30%). 100  $\mu$ L du lysat obtenu après sonication sont prélevés pour être déposés sur gel. Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 12000 x g. 100  $\mu$ L du surnageant (contenant notre protéine d'intérêt fusionnée à la GST) seront réservés pour être déposé sur gel. La protéine recombinante est ensuite purifiée sur le système Akta PrimePlus (GE HealthCare) à l'aide d'une colonne GSTrap HP 1 mL (Glutathione Sepharose High Performance column, GE Healthcare), préalablement équilibrée par le tampon de lavage. Des fractions de 1 mL sont éluées à un débit de 1 mL/min à 4°C avec un tampon Tris 50mM, pH 8, contenant 10mM de glutathion réduit. Les différentes fractions récupérées durant les étapes de production et purification sont par la suite analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-bisacrylamide à 12% (p/v). Ces conditions ont été utilisées pour vérifier l'expression et la purification de l'enzyme sauvage ainsi que de ses mutants.

#### **II.4.1. Clivage de la GST-β4GalT7ΔNt-60 par l'entérokinase**

Le clivage de la β4GalT7ΔNt-60 fusionnée à la GST a été réalisé pour étudier l'influence du partenaire de fusion sur l'activité enzymatique de la β4GalT7ΔNt-60. A terme, il avait été envisagé de réaliser des essais de cristallisation du domaine catalytique de la β4GalT7 en complexe avec les substrats xylosidiques d'intérêt.

Les étapes d'expression de la protéine couplée à la GST restent les mêmes (voir paragraphe *II.4- Expression et purification de la β4GalT7 sous forme soluble dans les bactéries E. coli BL21*) jusqu'à la récupération du surnageant qui sera incubé sur une colonne Glutathione Sepharose HP à 4°C pendant environ 18h. Les protéines fixées de façon non spécifique sur la colonne sont éliminées par lavage. La colonne sera ensuite lavée 5 fois avec du tampon *phosphate-buffered-saline* (PBS) en présence de 1mM de dithiothréitol (DTT) et de 1 mL de ce tampon contenant 1 unité/μL d'entérokinase qui est directement ajouté sur la colonne. Le tampon de clivage (10% v/v) est appliqué sur le mélange qui est transféré dans un falcon de 15 mL et incubé le lendemain (environ 18h après) à 18°C sous agitation à 110 rpm. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne contenant 500 μL de résine Glutathione Sepharose HP et le surnageant est récupéré par gravité. La colonne est ensuite lavée 4 fois avec du tampon PBS contenant 1 mM DTT afin de récupérer la β4GalT7ΔNt-60. La GST est finalement éluée avec le tampon Tris 50 mM, pH 8, contenant 10mM de glutathion réduit. Le degré de pureté de la protéine obtenue est vérifié par SDS-PAGE.

#### **II.5- Expression transitoire de la β4GalT7 sauvage ou mutée dans les cellules CHO-pgsB618**

L'expression de la β4GalT7 recombinante sauvage ou mutée dans les cellules CHO-pgsB618 (ATCC® CRL-2241TM, déficientes en β4GalT7) s'effectue par transfection en utilisant comme agent de transfection un polymère cationique, l'Exgen 500 selon les recommandations du fournisseur (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Les cellules sont préalablement cultivées dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, et 90% d'humidité. Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM/F12 (1:1) auxquels sont ajoutés 10% (v/v) SVF (sérum de veau fœtal), 1mM glutamine, 100U/mL pénicilline/streptomycine. Lorsque les cellules sont à 90% de confluence, le tapis cellulaire est lavé 2 fois par 5mL de tampon PBS et les cellules sont décollées par ajout de trypsine à 0,25% (v/v). Après centrifugation de la suspension cellulaire et comptage, les cellules sont réparties de façon

homogène dans de nouvelles boîtes de cultures à raison de  $10^6$  cellules par boîte de 75 cm<sup>2</sup>. Pour la mesure d'anabolisme des GAGs, les cellules sontensemencées sur des plaques 12 puits à raison de 150000 cellules/puits. Après 24 h, le milieu de culture est enlevé et la transfection des cellules est réalisée en déposant sur les cellules « à sec » un mélange de transfection contenant 2 µg d'ADN plasmidique et 5.5 µL d'Exgen 500 par puits (dilué dans 100µL de NaCl 0.9% (w/v)). L'Exgen 500 est un polymère cationique à base de polyéthylèneimine (PEI) appartenant à une nouvelle classe de vecteur génique non viral et non liposomal. Il présente une faible toxicité cellulaire et fonctionne efficacement en présence ou en absence de sérum. L'efficacité de l'Exgen 500 est liée à sa capacité à neutraliser et à condenser l'ADN, d'interagir avec les PGs anioniques de la membrane cellulaire et de provoquer l'internalisation du plasmide en formant des endosomes (Mislick *et al.*, 1996). Ensuite 400µL de milieu de culture DMEM F-12 sans sérum sont ajoutés par puits. Les plaques sont ensuite incubées 3h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% d'humidité puis 500µL du milieu de culture à 20% (v/v) de SVF sont ajoutés par puits. Le niveau d'expression de la protéine d'intérêt est ensuite contrôlé par western blot après dosage des protéines totales dans les homogénats des cellules

### **II.5.1- Dosage des protéines totales**

La concentration des protéines purifiées a été déterminée par fluorimétrie en utilisant le kit de dosage de protéines Qubit® (W306T, Fisher Scientific, Illkirch, France). Cette technique consiste à utiliser des sondes fluorescentes pour quantifier des biomolécules d'intérêt. Ces sondes émettent un signal de fluorescence uniquement lorsqu'elles sont liées à des molécules cibles spécifiques (comme des protéines par exemple), même à de faibles concentrations d'échantillons. Les concentrations protéiques des échantillons à doser sont déduites à partir de celles obtenues avec des échantillons contenant des concentrations connues de protéines.

Pour déterminer la concentration de protéines totales dans les lysats cellulaires ou bactériens, nous avons utilisé la technique de Bradford (1976) qui est une méthode colorimétrique utilisant le bleu de Coomassie qui se fixe sur les acides aminés basiques. Une gamme étalon est réalisée en parallèle des échantillons à doser à partir d'une solution de BSA et la DO à 595nm est mesurée 5min après l'ajout du colorant. Les concentrations protéiques totales des échantillons à doser sont déduites à partir de celle obtenues avec la gamme étalon.

### **II.5.2-Analyse de l'expression des protéines par western-blot**

25µg de protéines totales sont mélangées (v/v) dans du tampon de charge (1 :19 β-mercaptoethanol : laemmeli composé de 62,5mM tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) SDS, 25% glycérol, 0,01% (p/v) bleu de bromophenol), et dénaturées durant 5min à 95°C avant d'être déposées dans un gel de migration à 12% (p/v) acrylamide-bis acrylamide (pH 8,8). Un gel gradient 4-20% (Criterion™ TGX, BioRad) a spécifiquement été utilisé pour l'analyse de l'expression et de la glycanation de la décorine. La migration est effectuée à ampérage constant de 30mA (4mA/cm<sup>2</sup> gel) pendant 90 minutes. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (P2938, Sigma-Aldrich) en milieu semi-sec, dans un appareil d'électro-transfert Trans-Blot (Bio-Rad), sous un voltage constant de 14V par gel pendant 45 minutes. Après le transfert, la membrane est saturée durant 3 heures sous agitation par une solution à 5% (p/v) de BSA diluée dans un tampon TBST (*tris buffer saline tween*, composé de 150mM Tris-HCL (pH 8,5), 10mM NaCl, 1% (v/v) Tween 20, 0,02% (p/v) azide de sodium). Ensuite, la membrane est incubée toute la nuit en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (dans notre cas, l'anticorps utilisé est dirigé contre l'étiquette myc dans le cas de l'analyse de l'expression de la β4GalT7 et contre la protéine core de la décorine dans le cas de la détection de la glycanation de la décorine). Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois avec le tampon TBST et incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase qui entraînera une émission de lumière (photons) suite à l'incubation dans un tampon contenant le substrat de la peroxydase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et un chromophore qui sera oxydé à la suite de la réaction. La lumière émise lors de la réaction va imprimer un film photographique (Hyperfilm MP, Amersham, GE Healthcare Life Sciences) qui révélera la présence de la protéine dans nos échantillons.

### **II.5.3- Mesure de l'activité enzymatique par HPLC (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) en phase inverse et détermination des constantes cinétiques ( $K_m$ et $k_{cat}$ )**

Afin d'évaluer puis de comparer les paramètres cinétiques des enzymes mutées à celles l'enzyme sauvage, nous déterminons *in vitro* les vitesses initiales ( $V_i$ ) obtenues pour chaque réaction enzymatique aux différentes concentrations en substrat (donneur ou accepteur). Les réactions enzymatiques sont réalisées dans un volume final de 50µL en présence de 200ng de protéine purifiée, 100mM de tampon cacodylate de sodium (pH 7) contenant 10mM MnCl<sub>2</sub> en

faisant varier la concentration de 4-methylombélliférone-xyloside (4-MOX) de 0 à 5mM en présence d'une concentration fixe en UDP-Galactose (1mM), ou en faisant varier la concentration en UDP-Galactose de 0 à 5mM en maintenant la concentration en 4-MOX fixe à 5mM. Les mélanges réactionnels sont incubés 30 minutes à 37°C puis la réaction est arrêtée sur glace et par ajout de 5µL de HCL 6N qui entraîne la précipitation des protéines. Le temps d'incubation de 30 minutes correspond à des conditions pour lesquelles la cinétique enzymatique est encore en phase linéaire, c'est-à-dire que la quantité de produit formée évolue de façon linéaire en fonction du temps d'incubation et de la quantité de protéines utilisées. . Les mélanges réactionnels sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants contenant les substrats et produits de la réaction enzymatique sont alors analysés par HPLC en phase inverse sur une colonne C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) en utilisant une chaîne CHLP Alliance (Waters) équipée d'un détecteur UV-visible Shimadzu SPD-10A. La phase mobile permettant la séparation du produit de réaction du substrat non métabolisé est composée d'acétonitrile 13% (v/v), d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,02% (v/v) et d'eau distillée 87% (v/v). Le produit de la réaction est détecté en suivant l'absorbance à 320 nm puis quantifié au moyen d'une gamme étalon réalisée en parallèle des échantillons à partir de dilutions successives de 4-MOX allant de 0 à 20µmol. Les  $V_i$  obtenues pour chaque concentration en substrat (donneur ou accepteur) sont ensuite calculées en divisant cette quantité de produits formés par le temps de réaction. Les activités spécifiques (AS) obtenues sont finalement déterminées pour chaque concentration en substrat (donneur ou accepteur) en rapportant chaque  $V_i$  à la quantité totale d'enzyme purifiée. Les AS seront donc exprimées en unité de temps<sup>-1</sup> (dans notre cas, en min<sup>-1</sup>). Les graphiques obtenus en reportant les AS en fonction des concentrations en substrats permettent alors d'accéder aux valeurs de  $K_m$  (constante de Michaelis) et de  $k_{cat}$  (constante catalytique) à l'aide d'un ajustement non linéaire grâce au logiciel Sigma Plot 12.0 (Erkraft, Allemagne).

#### **II.5.4- Analyse de la biosynthèse des chaînes de GAG à partir du xyloside exogène 4-MOX par incorporation du $\text{Na}_2[^{35}\text{SO}_4]$**

Les cellules CHO-pgsB618 (déficientes en  $\beta 4\text{GalT7}$ ) sont, dans un premier temps, transfectées par le plasmide pcDNA3.1a(+) vide (ne contenant pas le gène codant la  $\beta 4\text{GalT7}$ ) ou contenant l'ADNc codant la  $\beta 4\text{GalT7}$  sauvage ou mutée. 24 h après la transfection, les cellules sont incubées avec un donneur de soufre radiomarqué ( $\text{Na}_2[^{35}\text{SO}_4]$ ) pendant 18 h à

raison de 10  $\mu\text{Ci}/\text{mL}/\text{puits}$ , en présence de concentrations croissantes en 4-MOX allant de 0 à 20 $\mu\text{M}$ . Le milieu de culture est ensuite collecté et les GAGs néosynthétisés radiomarqués sont purifiés après dépôt sur une colonne de Sephadex G50 fine (GE Healthcare Life Sciences). Les chaînes de GAG sont éluées en deux fractions de 1.5mL par de l'eau ultra pure puis le taux de radioactivité est évalué par comptage en scintillation liquide (sur un compteur Packard P2900). Le niveau d'expression de la  $\beta 4\text{GalT}7$  sauvage ou mutée dans les cellules CHO-pgsB618 est évalué parallèlement par immunoblot comme décrit plus bas. Ces mêmes conditions ont également été utilisées pour réaliser la quantification des chaînes de GAG néosynthétisées dans deux lignées cellulaires cancéreuses humaines: les lignées SW1353 (chondrosarcome) et MDA-MB231 (cancer du sein).

### **II.5.5- Analyse du niveau de glycanation de la protéine-core d'un PG modèle, la décorine, par Western-Blot**

Afin d'évaluer l'effet des mutations de la  $\beta 4\text{GalT}7$  sur le niveau de glycanation d'un PG modèle endogène, les cellules CHO-pgsB618 exprimant stablement la protéine core de la décorine humaine ont d'abord été sélectionnées. Pour ce faire, les cellules CHO-pgsB618 déficientes en  $\beta 4\text{GalT}7$  ont tout d'abord été transfectées par le vecteur pcDNA-décorine contenant un gène de résistance à la généticine (comme décrit précédemment, Talhaoui *et al.*, 2010). Les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés grâce à leur résistance à la généticine (G418). Les cellules résistantes forment des colonies qui seront isolées pour être mises en culture de façon indépendante. Chaque colonie correspondra à un clone cellulaire exprimant de façon stable la décorine. Nous vérifions l'expression de nos protéines d'intérêt dans toutes les colonies par western blot. Ensuite ces cellules seront transfectées par le vecteur pcDNA- $\beta 4\text{GalT}7$  permettant l'expression de l'enzyme sauvage ou mutée. 12 heures après transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu sans sérum pour 48 heures. Le milieu est récupéré et concentré 10 fois à l'aide de concentrateurs Amicon® Ultra (Merck Millipore, Fontenay sous-Bois, France). Les protéines totales sont ensuite dosées par la méthode de Bradford (voir paragraphe « Dosage des protéines totales ») et 25  $\mu\text{g}$  de protéines sont déposées sur un gel gradient 4-20 % (Criterion™ TGXTM, Bio-Rad). La présence de la décorine est révélée par immunoblot en utilisant comme anticorps primaire un anticorps anti-décorine. Le contrôle de l'expression de la  $\beta 4\text{GalT}7$  est réalisé par western blot sur des lysats cellulaires préparés à partir de cellules mises en suspension dans un tampon 5 mM

HEPES (pH 7.4), saccharose 250 mM (environ 100  $\mu$ L/puits) puis lysées mécaniquement par sonication 3 x 10 secondes sur glace à l'aide d'un sonicateur (BANDELIN sonoplus GM70, Berlin, Allemagne). L'analyse de l'expression des protéines présentes dans les différents échantillons s'est réalisée selon la procédure expérimentale décrite précédemment (paragraphe « Analyse de l'expression des protéines par western-blot »).

## **II.6- Inhibition de l'activité enzymatique de la $\beta$ 4GalT7 par des xylosides**

Afin de déterminer le potentiel inhibiteur (constante d'inhibition,  $K_i$  et concentration inhibitrice 50%,  $IC_{50}$ ) des molécules xylosidiques modifiées (4H-Xyl-NP, 4H-MOX, et 4F-MOX) sur l'activité de la  $\beta$ 4GalT7, nous réalisons des cinétiques enzymatiques dans un volume de 50 $\mu$ L en présence de 200ng de protéines purifiées, 0.5mM 4-MOX, 1mM UDP-Gal et en présence de concentrations croissantes de xyloside à tester (0 à 5mM). Le mélange réactionnel se compose d'un tampon 100mM cacodylate de sodium (pH 7.0) contenant 10mM  $Mn^{2+}$ . Les mêmes conditions expérimentales sont utilisées pour déterminer les activités enzymatiques en présence des dérivés xylosidiques (voir paragraphe « Mesure de l'activité enzymatique par HPLC (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) en phase inverse »). Le produit de la réaction est détecté en mesurant l'absorbance à 320 nm puis quantifié au moyen d'une gamme étalon réalisée en parallèle des essais et contenant des quantités connues de produit. Nous reportons ensuite les valeurs des activités spécifiques en fonction des concentrations en inhibiteur. Les courbes obtenues permettent de déterminer la valeur de l' $IC_{50}$  à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5. Le  $K_i$  (Constante de dissociation du complexe enzyme/inhibiteur) sera calculé à partir de l' $IC_{50}$  (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff (1973).

### **II.6.1- Analyse de l'inhibition de la biosynthèse des chaînes de GAG par des xylosides**

Les cellules CHO-pgsB618 ont été transfectées par le vecteur pcDNA vide ou contenant le gène de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage. 24 heures après transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu Fisher contenant 10 $\mu$ Ci/mL de  $Na_2[^{35}SO_4]$ , dans lequel sont ajoutées des concentrations croissantes (0 à 100  $\mu$ M) de chaque xyloside potentiellement inhibiteur (4H-Xyl-NP, 4H-MOX, ou 4F-MOX) de façon indépendante en présence de 5  $\mu$ M de 4-MOX pendant 16 heures. Le milieu de culture est récupéré et les chaînes de GAG radiomarquées

sont dessalées sur une colonne Sephadex G50 fine. La radioactivité associée aux GAGs néosynthétisés a été mesurée par comptage en scintillation liquide. Ces mêmes manipulations sont également effectuées sur deux autres lignées cellulaires cancéreuses : les SW1353 et les MDA-MB231 afin d'évaluer l'anabolisme des GAGs en présence des composés xylosidiques.

### **II.6.2- Analyse par immunoblot de l'inhibition de la glycosylation de la décorine par des xylosides**

Les cellules CHO-pgsB618 exprimant de façon stable la protéine core de la décorine humaine sont ensemencées dans des plaques de 12 puits à raison de  $15 \times 10^4$  cellules/puits. Le lendemain, ces cellules seront co-transfectées par le plasmide pcDNA- $\beta$ 4GalT7. 24 heures après la co-transfection, les cellules seront traitées ou non par des concentrations croissantes en xylosides (4H-Xyl-NP, 4H-MOX, ou 4F-MOX) allant de 0 à 0,5mM pendant 48 heures, puis le milieu de culture est récupéré, concentré (10 fois) à l'aide de concentrateur Amicon® Ultra (Merck Millipore) et 25  $\mu$ g de protéines sont analysés par immunoblot (comme décrit précédemment dans le paragraphe « Analyse de l'expression des protéines par western-blot ») en utilisant un anticorps anti-décorine humaine .

### **II.7- Test de viabilité cellulaire**

Les cellules de chondrosarcomes SW1353, de tumeur mammaire MDA-MB231 ou les cellules déficientes CHO-pgsB618 sont ensemencées dans des plaques de 12 puits à raison de  $10^5$  cellules/puits. 12 heures après ensemencement, les cellules ont été cultivées en présence de différentes concentrations (0 à 0,5mM) de 4-MOX ou de xyloside fluoré (4F-MOX). Après 48 heures, les cellules sont collectées et comptées à l'aide d'un compteur automatique de cellules (TC20, Bio-Rad) en présence d'un colorant vital (bleu de trypan), qui permettra de colorer sélectivement les cellules mortes afin de déterminer la viabilité et la mortalité cellulaires dans les conditions de culture utilisées. Le résultat sera donc exprimé en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules totales.

### **II.8- Test de prolifération cellulaire**

Afin d'évaluer l'effet antiprolifératif du xyloside fluoré (4F-MOX), nous avons choisi d'utiliser une technique de marquage utilisant la CFSE (*carbofluorescein succinidyl ester*). Cette méthode consiste à marquer les cellules par des sondes fluorescentes qui vont se fixer



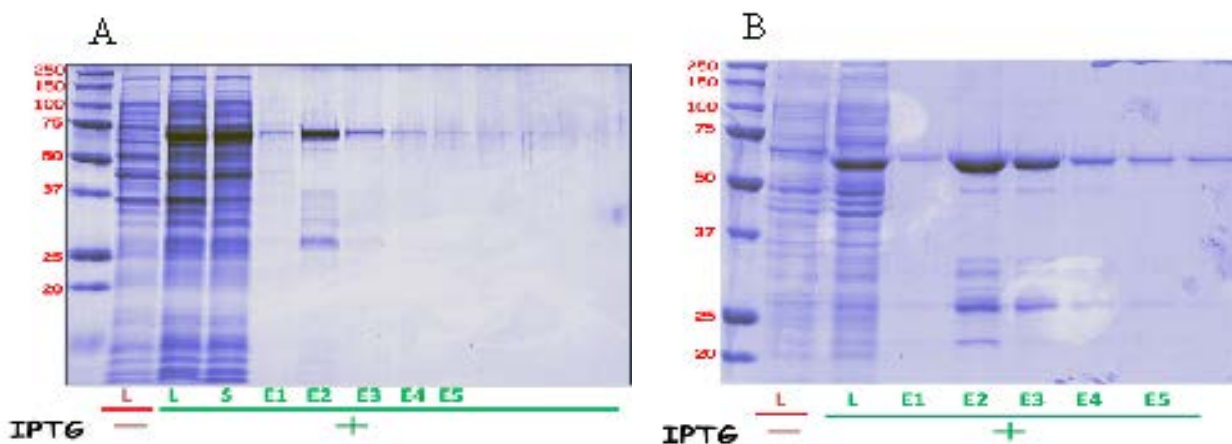
par des liaisons covalentes aux protéines cytoplasmiques par l'intermédiaire de leur groupe succinidyl, en réagissant notamment avec les groupements aminés des chaînes latérales des résidus lysines et d'autres acides aminés. Cette réaction de couplage permet d'avoir une répartition homogène et stable des sondes fluorescentes (et donc du signal) dans le cytoplasme. A chaque division cellulaire, la cellule perd la moitié de son marquage fluorescent qui « se répartira » dans les deux nouvelles cellules filles générées après la mitose. Cela nous permettra de suivre la prolifération cellulaire en quantifiant par cytométrie en flux la diminution de l'intensité de la fluorescence de la CFSE en fonction du temps. Les cellules des lignées tumorales SW1353 (chondrosarcome) et MDA-MB231 (tumeur mammaire) seront incubées séparément 20min à 37°C, en présence de 1,5µL d'une solution de CFSE (Invitrogen,) à raison de 5mM de CFSE pour  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Le marquage est arrêté en ajoutant du SVF (5 fois le volume initial). Après 5min d'incubation à température ambiante, les cellules sont centrifugées durant 5min à 200 x g puis lavées 2 fois avec 10mL de PBS. Le culot est ensuite repris dans du milieu de culture complet pour obtenir une densité cellulaire de  $10^6$  cellules /mL. Enfin, les cellules sont réparties dans des plaques de 12 puits en ensemençant  $10^5$  cellules/puits. Les cellules sont finalement récoltées après 48h et 72h de culture, centrifugées pendant 5min à 200 x g puis analysées par cytométrie en flux.

# *Résultats*

## **I – Production, purification et caractérisation cinétique des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86**

### **I.1- Expression et purification des GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86 dans la bactérie *E. coli***

En vue des études cinétiques, une technique de production et de purification de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine exprimée en fusion avec la GST a été mise en œuvre (Talhaoui *et al.*, 2010). Pour ces travaux, une construction dans un vecteur d'expression pET-41a permettant la fusion du domaine catalytique de la protéine délétée de 60 acides aminés N-terminaux (GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60) couplée à la GST (Glutathion-S-Transférase) a été utilisée. Une seconde construction, délétée des 86 acides aminés N-terminaux (GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86) a également été produite et purifiée. Nous souhaitons par cette deuxième construction éliminer la région « stem » de l'enzyme (domaine situé entre le segment transmembranaire et le domaine catalytique), élément de structure désorganisé de la protéine en vue des études cristallographiques. Les protéines ont été produites dans la bactérie *E. coli* BL21 puis purifiées par chromatographie d'affinité sur le système AKTA prime (GE Healthcare Life Sciences), selon la procédure décrite dans la section Matériels et méthodes. Les niveaux d'expression et de purification des protéines ont été vérifiés par gel SDS-PAGE, et les résultats de ces purifications montrent que les deux formes de l'enzyme ( $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-86) fusionnées à la GST sont correctement exprimées et purifiées (Figure 21 A et B).

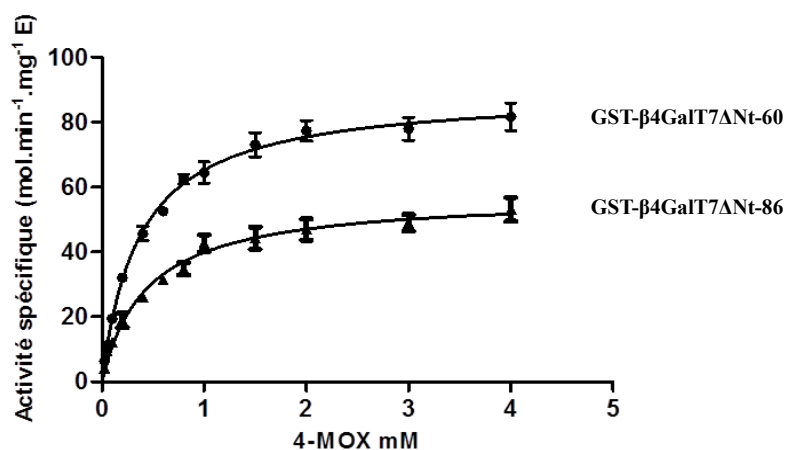


**Figure 21: Expression et purification des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86.** Les protéines ont été exprimées dans la bactérie *E. coli* BL21, puis purifiées par chromatographie d'affinité sur résine Sepharose-glutathion. Les différentes fractions éluées ont ensuite été analysées par SDS-PAGE. Nous avons déposé 25 μg de protéines pour le lysat non-induit et induit à l'IPTG, 12 μg de protéines pour le surnageant, et ≤ 3 μg pour les fractions de purification. A. GST-β4GalT7ΔNt-60 : Lysat cellulaire de bactéries avant induction (L-) et après induction à l'IPTG (L+), surnageant (S) après centrifugation et fractions protéiques après élution par le glutathion réduit (E1 à E5). B. GST-β4GalT7ΔNt-86 : Lysat cellulaire de bactéries avant induction (L-) et après induction à l'IPTG (L+), fractions protéiques après élution par le glutathion (E1 à E5).

Les conditions utilisées pour la purification de l'enzyme permettent de l'obtenir en quantité suffisante pour des études cinétiques : 2 à 3 mg de protéines à partir de 200 mL de culture. Cependant, nous avons toujours observé la présence d'un contaminant aux environs de 30 kDa dans les fractions d'élution des fractions E2, E3 et E4 pour la GST-β4GalT7ΔNt-86 et seulement dans la fraction d'élution E2 pour la GST-β4GalT7ΔNt-60. Ceci suggère une coupure protéolytique de la protéine fusionnée au cours de l'étape de purification car cette taille de protéine correspond à celle de la GST. Cette hypothèse a été confirmée par immunoblot au moyen d'anticorps anti-GST (résultats non montrés). Pour la suite de ces travaux, nous utiliserons les protéines issues de la fraction E3 qui contient peu de contaminants protéiques.

### **I.2-Détermination des paramètres cinétiques des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86**

Afin de vérifier le comportement enzymatique *in vitro* des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86, une série de cinétiques en présence d'une concentration fixe d'UDP-Gal (1 mM) et de concentrations croissantes en 4-MOX (0- 4 mM) a été réalisée comme décrit dans la section Matériel et méthodes. La formation du produit de réaction a été suivie par HPLC et les activités spécifiques ont été reportées en fonction de la concentration en 4-MOX (Figure 22).



**Figure 22: Détermination des paramètres cinétiques de la GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86 vis-à-vis du substrat accepteur.** Le milieu réactionnel contient 150 ng de protéine purifiée à une concentration fixe d'UDP-Gal (1 mM) et des concentrations croissantes de 4-MOX (0,05 à 4 mM). Les cinétiques ont été traitées par régression non linéaire à l'aide du logiciel Sigma Plot 12.0. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SD d'essais en double réalisés sur trois expériences indépendantes.

Les paramètres cinétiques des deux formes de l'enzyme de fusion sont présentés dans le tableau 4 :

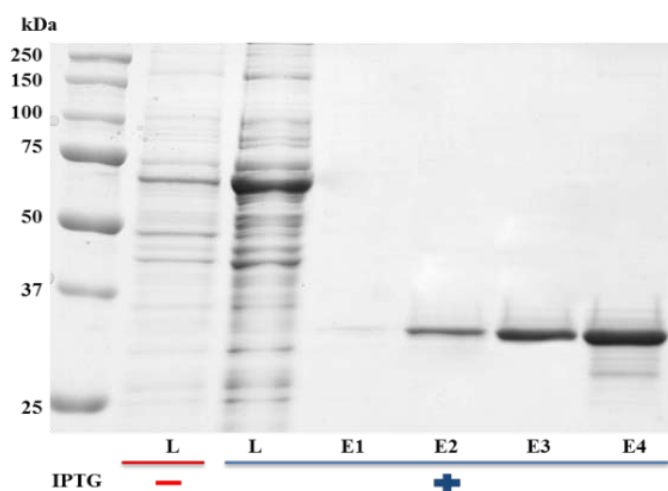
Enzyme	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ ( $\text{min}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ )
GST-β4GalT7ΔNt-60	$0,35 \pm 0,02$	$90,5 \pm 2,3$	258
GST-β4GalT7ΔNt-86	$0,43 \pm 0,03^*$	$54,6 \pm 3,7^*$	127

**Tableau 4: Constantes cinétiques des GST-β4GalT7ΔNt-60 et GST-β4GalT7ΔNt-86 vis-à-vis du substrat accepteur 4-MOX.** Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SD d'essais en double réalisés sur trois expériences indépendantes. \*, valeur significativement différente,  $p < 0,05$ .

Nous remarquons que le  $K_m$  obtenu pour la GST-β4GalT7ΔNt-86 vis-à-vis du 4-MOX est légèrement supérieur à celui trouvé pour la GST-β4GalT7ΔNt-60 et que le  $k_{cat}$  pour la GST-β4GalT7ΔNt-86 est de 35% inférieur à celui pour la GST-β4GalT7ΔNt-60 (Tableau 4). L'efficacité enzymatique de la GST-β4GalT7ΔNt-86 vis-à-vis du substrat accepteur est par conséquent inférieure de 2 fois à celle de la GST-β4GalT7ΔNT-60. Ce résultat nous a amené à poursuivre nos investigations enzymatiques et structurales avec la forme GST-β4GalT7ΔNt-60.

### I.3- Étude de l'influence du domaine GST sur l'activité enzymatique du domaine catalytique de la $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60

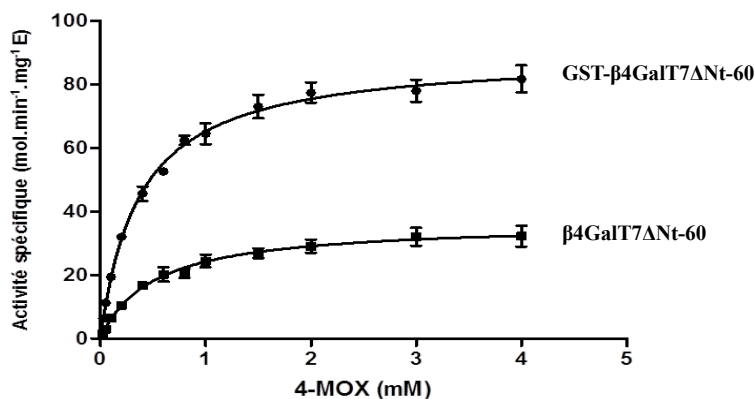
Le clivage de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 fusionnée à la GST a été entrepris afin d'étudier l'influence de ce partenaire de fusion sur son activité enzymatique. Pour ce faire, la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 a été purifiée comme décrit précédemment puis soumise à une digestion par l'entérokinase pendant 18 h à 16°C selon un protocole qui a été préalablement optimisé (selon la procédure indiquée dans la section Matériel et méthodes). Les fractions correspondant aux différentes étapes du clivage ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 23).



**Figure 23: Expression, clivage et purification de GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60.** Les protéines ont été exprimées dans la bactérie *E. coli* BL21, puis digérées par l'entérokinase et enfin purifiées par chromatographie d'affinité sur résine Sepharose-glutathion. Les différentes fractions éluées ont ensuite été analysées par SDS-PAGE. Nous avons déposé 25  $\mu$ g de protéines pour le lysat non-induit et induit à l'IPTG, et  $\leq 3$   $\mu$ g pour les fractions de purification. (L-) : Lysat cellulaire de bactéries avant induction, (L+) : lysat après induction à l'IPTG, (E1 à E4) : fractions protéiques après élution par le tampon Tris.

Le résultat indique clairement que le protocole suivi nous permet d'obtenir le domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 pure sans partenaire de fusion (Figure 23).

Afin de vérifier si le domaine catalytique présente un comportement cinétique *in vitro* comparable à celui de l'enzyme fusionnée à la GST, une série de cinétiques en fonction de la concentration en 4-MOX a été réalisée avec la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 ainsi qu'avec la forme clivée. La formation du produit de réaction a été suivie par HPLC et les activités ont été reportées en fonction de la concentration en 4-MOX (Figure 24). Le résultat de ces cinétiques est résumé dans le tableau 5.



**Figure 24: Paramètres cinétiques des GST-β4GalT7ΔNt-60 et β4GalT7ΔNt-60 vis-à-vis du substrat accepteur.** Le milieu réactionnel contient 150 ng de protéine purifiée à une concentration fixe d'UDP-Gal (1 mM) et des concentrations croissantes de 4-MOX (0-4 mM). Les cinétiques ont été traitées par régression non linéaire à l'aide du logiciel SigmaPlot 12.0. Chaque valeur correspond à la moyenne ± SD d'essais en double réalisés sur trois expériences indépendantes.

Enzyme	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )
GST-β4GalT7ΔNt-60	$0,35 \pm 0,02$	$90,5 \pm 2,3$	258
β4GalT7ΔNt-60	$0,50 \pm 0,04^*$	$35,9 \pm 3,1^*$	72

**Tableau 5: Constantes cinétiques des GST-β4GalT7ΔNt-60 et β4GalT7ΔNt-60 vis-à-vis du substrat accepteur.** Chaque valeur correspond à la moyenne ± SD d'essais en double réalisés sur trois expériences indépendantes. \*, significativement différentes,  $p < 0,05$ .

Ces résultats montrent que la séparation du partenaire de fusion GST de l'enzyme entraîne une légère augmentation du  $K_m$  (d'un facteur 1,35) et une diminution du  $k_{cat}$  (44%) comparés aux valeurs des constantes cinétiques obtenues pour la GST-β4GalT7ΔNt-60 (Tableau 5). La séparation du domaine catalytique β4GalT7ΔNt-60 du partenaire GST se traduit donc par une réduction de l'efficacité enzymatique d'un facteur 3,5 vis-à-vis du 4-MOX. Ces valeurs indiquent que l'enzyme couplée à son partenaire de fusion prend en charge plus efficacement le 4-MOX comparée à sa forme dépourvue de partenaire dans nos conditions expérimentales *in vitro*. Des investigations physico-chimiques et structurales poussées seraient nécessaires afin d'élucider l'influence de la GST sur l'activité enzymatique de la protéine.

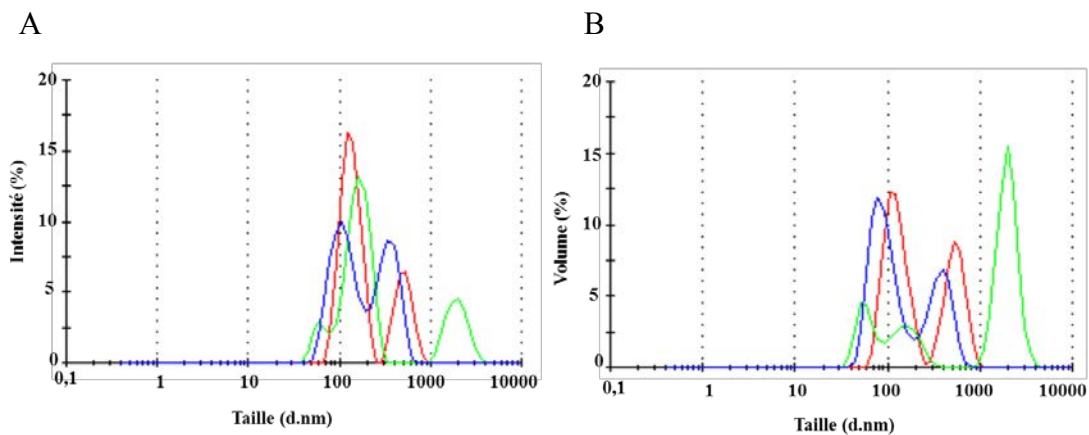
Afin d'étudier la structure du site actif de la β4GalT7, et en parallèle de l'approche par mutagenèse dirigée, nous avons initié des travaux préliminaires à la caractérisation structurale du domaine catalytique de la β4GalT7ΔNt-60. Pour ce faire, nous avons exprimé et purifié la

GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 puis clivé le partenaire de fusion (GST) par l'entérokinase afin d'obtenir le domaine catalytique seul. Nous avons analysé par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) l'homogénéité de la solution protéique dans le tampon de purification initial. Nous avons ensuite commencé par tester l'effet de différents tampons sur la solubilité et la stabilité de la protéine par « *Thermal Shift Assay* » (TSA) dans le but de sélectionner le tampon assurant une la meilleure stabilité structurale de la protéine tout en améliorant sa solubilité.

#### I.4– Effet des tampons sur la stabilité thermodynamique et sur la solubilité de la $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 en vue d'une étude structurale par cristallographie

##### I.4.1- Étude de la solubilité de la $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

L'homogénéité de la solution protéique dans le tampon 10 mM PBS + 10 mM DTT, pH 7.4 utilisé pour la purification doit être vérifiée en vue des essais de cristallographie. Dans ce contexte, nous avons procédé à l'analyse de la microdispersion de la protéine en solution par diffusion dynamique de la lumière. Les résultats montrent que la solution de  $\beta$ 4GalT7Nt $\Delta$ -60 n'est pas homogène dans les conditions expérimentales utilisées. La protéine est présente sous différentes conformations (comme le montrent les différents pics observés) et a tendance à s'agréger, ce qui est incompatible avec la cristallisation de la protéine dans ce tampon (Figure 25).

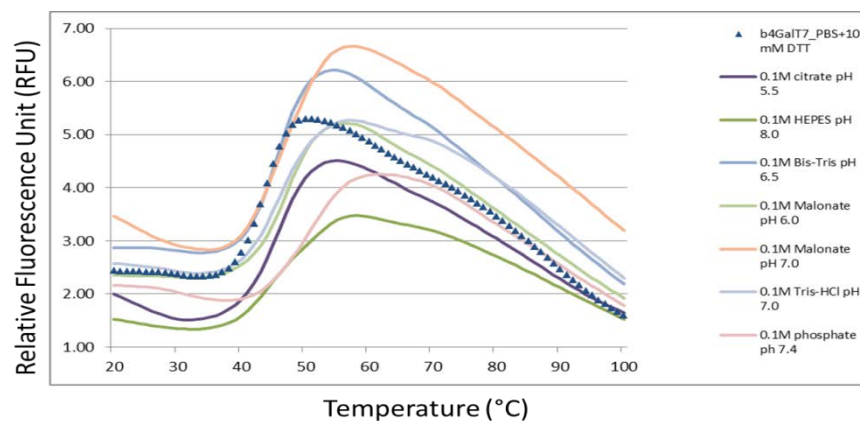


**Figure 25:** Spectres de diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 en solution dans le tampon 10 mM PBS, pH 7,4 + 10 mM DTT. (A) Les spectres montrent l'intensité de diffusion de la lumière en fonction de la distribution de la protéine en solution. (B) Les spectres montrent l'intensité de diffusion de la lumière en fonction la masse de la protéine. Les trois couleurs (rouge, bleu et vert) représentent trois mesures différentes réalisées sur le même échantillon.



#### I.4.2- Etude de la stabilité thermique de la $\beta$ 4GalT7 purifiée dans différents tampons par la technique de « Thermal Shift Assay » (TSA)

La technique d'analyse appelée « *Thermal Shift Assay* » (TSA) permet d'évaluer la stabilité thermique des protéines et les facteurs affectant cette stabilité. Le principe est basé sur la mesure de la fluorescence émise par une sonde qui interagit avec les protéines et dont l'intensité de fluorescence émise augmente à proximité des régions hydrophobes de la protéine. Au fur et à mesure de l'augmentation de la température, la protéine est progressivement dénaturée, exposant les régions hydrophobes non accessibles à la sonde lorsque la protéine est repliée, ce qui se traduit par une augmentation du signal de fluorescence jusqu'à une valeur maximale correspondant à un état totalement dénaturé. Pour les températures plus élevées, ce signal de fluorescence décroît témoignant de l'agrégation protéique ou de la dissociation de la sonde et de la protéine (Figure 26). L'analyse des courbes de dénaturation (Figure 26) permet de déterminer la valeur de la température de fusion (*melting* temperature,  $T_m$ ) de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 en fonction des différentes conditions de tampons et de pH. Cette analyse nous a permis de cribler rapidement plusieurs conditions de tampons et de pH les plus favorables à la stabilité de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 et pouvant être adaptées pour des études structurales par cristallographie (Tableau 6).



**Figure 26:** Courbe de dénaturation thermique de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 déterminées par *Thermal Shift Assay* (TSA) en fonction de la nature du tampon et du pH. Les différentes courbes représentent l'intensité de la fluorescence émise par la sonde lors de la dénaturation de la protéine en fonction de la température. La courbe portant les icônes en forme de triangles représente la protéine dans les conditions initiales de purification après coupure du partenaire de fusion (GST), et sert de référence par rapport aux autres conditions.

Condition	Tampon	pH	T <sub>m</sub> (°C)
1	PBS 10 mM + DTT	7,4	43
2	Citrate 0,1 M	5,5	45
3	HEPES 0,1 M	8,0	48,5
4	Bis-Tris 0,1 M	6,5	45
5	Malonate 0,1 M	6,0	48,5
6	Malonate 0,1 M	7,0	45
7	Tris-HCL 0,1 M	7,0	45,5
8	Phosphate 0,1 M	7,4	50

**Tableau 6: Température de fusion (T<sub>m</sub>) de la  $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 déterminée par *Thermal Shift Assay* (TSA) en fonction de la nature du tampon et du pH.**

Les résultats montrent que la température de fusion de la protéine déléetée de son partenaire de fusion (GST) est située aux alentours de 55°C (Figure 26), ce qui confirme la bonne stabilité structurale et/ou thermodynamique de nos échantillons à 37°C, température qui est utilisée pour les mesures d'activité enzymatique *in vitro*. Ces résultats nous permettent d'ores à déjà d'exclure les conditions 1 (PBS 10 mM + DTT, pH 7.4), 2 (Citrate 0.1 M, pH 5.5), 4 (Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5), 6 (Malonate 0.1 M, pH 7.0) et 7 (Tris-HCL 0.1 M, pH 7.0) pour lesquelles les T<sub>m</sub> obtenues sont les plus basses (aux environs de 43-45°C, Tableau 8), témoignant d'une stabilité inférieure de la protéine dans ces conditions. Au contraire, les conditions 3 (HEPES 0.1 M, pH 8.0), 5 (Malonate 0.1 M, pH 6.0) et 8 (Phosphate 0,1 M, pH 7.4), pour lesquelles les T<sub>m</sub> sont les plus élevées (comprises entre 48 et 50°C) peuvent être retenues pour des investigations complémentaires.

En conclusion, nous avons initié les étapes préparatoires aux essais de cristallographie, afin d'optimiser les conditions de purification pour l'obtention d'une enzyme séparée du partenaire de fusion soluble et non agrégée. Nous avons analysé par DLS la solubilité de la protéine clivée dans les conditions initiales de purification. Le tampon 10 mM PBS, 10 mM DTT pH 7,4 conduit à l'obtention de solutions protéiques polydisperses, traduisant un niveau encore insuffisant, voire médiocre de solvation de la protéine. Ensemble, ces résultats encouragent la recherche de tampons capables de solubiliser correctement la protéine tout en conservant sa stabilité thermique.

L'étude de la stabilité thermodynamique de cette protéine dans différents tampons et à différents pH indique clairement que la protéine conserve une bonne stabilité structurale jusqu'aux environs de 40°C (Figure 26), température compatible avec la mise en œuvre des

tests enzymatiques et de compétition/inhibition *in vitro* qui se déroulent à 37°C. La solubilité de la protéine doit encore être analysée par DLS dans les tampons de pH et de salinité assurant la meilleure stabilité thermique. Des essais sont en cours pour vérifier et améliorer la qualité de la préparation protéique purifiée en l'absence du partenaire de fusion.

## **II- Recherche des résidus d'acides aminés potentiellement impliqués dans la reconnaissance et la fixation du substrat accepteur de la $\beta$ 4GalT7 humaine**

La  $\beta$ 4GalT7 a la capacité de prendre en charge des substrats xylosidiques exogènes pour initier la synthèse des chaînes de GAG. Des résultats précédents obtenus au laboratoire ont identifié un résidu tryptophane central au niveau du site actif, à la fois en interaction avec le pyrophosphate du substrat donneur et en interaction de stacking avec le xylose. Cependant, les bases moléculaires de l'interaction entre l'enzyme et son substrat accepteur ne sont pas encore complètement établies. Notre travail a donc porté sur l'identification des acides aminés impliqués dans le site de fixation du xyloside de manière à fournir des bases rationnelle au « design » d'inhibiteurs/substrats de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine.

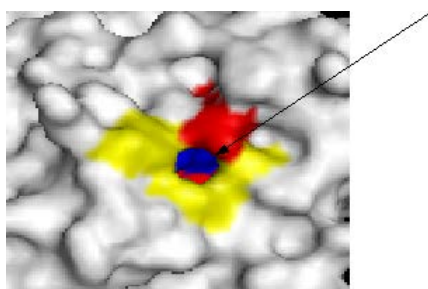
La stratégie utilisée repose sur : 1) la modélisation moléculaire du site de fixation du substrat xylosidique de la  $\beta$ 4GalT7 humaine réalisée par l'équipe de C. Breton (CERMAV-Grenoble) en s'appuyant sur l'analyse des structures cristallographiques de la  $\beta$ 4GalT7 de drosophile et humaine récemment publiées (Ramakrishnan *et al.*, 2010 et Tsutsui *et al.*, 2013), et 2) sur la mutagenèse dirigée des résidus prédits importants au niveau du site afin d'en analyser expérimentalement le rôle fonctionnel.

Notre attention s'est également portée sur le résidu arginine 270 (R270), résidu dont la mutation en cystéine est impliquée dans la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos (mutant R270C) (Seidler *et al.*, 2006). Des travaux réalisés au laboratoire suggèrent que cette mutation réduit l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat xylosidique (Bui *et al.*, 2010). Nous avons donc souhaité poursuivre l'étude du rôle de ce résidu au niveau du site de fixation du substrat accepteur.

### **II.1- Modélisation moléculaire du site de fixation du substrat xylosidique de la $\beta$ 4GalT7**

Les modélisations moléculaires ont tout d'abord identifié trois résidus tyrosine Y194, Y196 et Y199 bordant l'entrée de la poche de fixation du substrat accepteur (Figure 27). Le docking

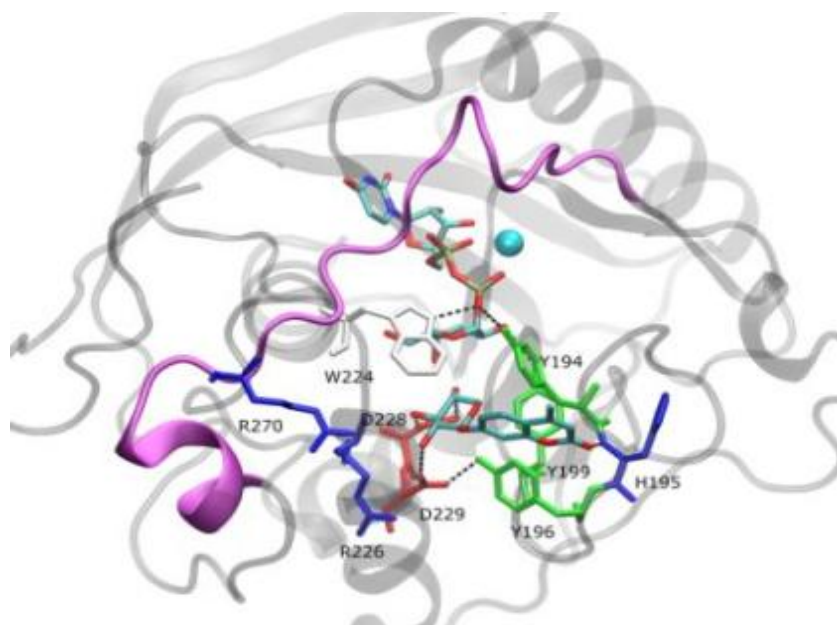
moléculaire du 4-MOX au sein du site actif de la  $\beta$ 4GalT7 complexée à l'UDP-Gal suggère que la chaîne latérale de la tyrosine en position 194 pourrait stabiliser le positionnement du 4-MOX par interaction de type stacking entre l'aglycone du substrat accepteur et le cycle aromatique de la tyrosine, et former des liaisons hydrogènes avec la partie pyrophosphate du substrat donneur (Figure 28). Le résidu Y196 interagirait quant à lui par des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale de l'aspartate 229 (D229) permettant ainsi la formation de liaison hydrogène entre l'autre groupement carboxyle du résidu D229 et l'atome d'oxygène en position 2 (O2) du xylose, ce qui pourrait orienter le positionnement du substrat accepteur dans la poche catalytique (Figure 28). L'orientation spatiale du résidu Y199 dans la poche catalytique permet la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de sa chaîne latérale de la tyrosine et l'atome O2 du galactose (Figure 28). La structure proposée a également permis de dégager le résidu arginine en position 226 (R226) comme potentiellement important dans l'interaction de l'enzyme avec le substrat accepteur. En effet, avec la triade aromatique Y194, Y196 et Y199, ce résidu R226 participerait à l'architecture de l'entrée du site de fixation du substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 humaine (Figure 27). Il est intéressant de noter que le résidu R226 constitue le seul résidu hydrophile (basique) interagissant probablement avec le substrat xylosidique à l'entrée de sa poche de fixation et jouerait peut-être un rôle dans le bon positionnement de ce dernier dans les toutes premières étapes de l'interaction enzyme-substrat. En outre, le positionnement de ce résidu à proximité du site de fixation du xylose permet à ce dernier de former une liaison hydrogène avec l'atome O3 du xylose du 4-MOX (Figure 28).



**(Figure 27): Analyse structurale de l'entrée de la poche du site de fixation du substrat accepteur.** En surface, en jaune sont représentés les résidus aromatiques Y194, Y196 et Y199 et en rouge le résidu R226. Visibles dans le fond de la poche, un résidu basique en rouge (R141), puis les résidus acides carboxyliques en bleu (E227 et D228). L'entrée du site de fixation du substrat accepteur est indiquée par une flèche.

Le modèle structural de l'enzyme en complexe avec l'UDP-Gal et le 4-MOX a également permis d'identifier l'histidine 195 comme un résidu à prendre à compte dans notre investigation structure-fonction. Positionnée à proximité de l'aglycone du substrat accepteur (le groupement MO), H195 pourrait en effet former une liaison hydrogène impliquant un atome d'azote du squelette peptidique et le groupement carbonyle du 4-MOX, ainsi qu'avec l'O1 de l'aglycone.

En plus des résidus décrits précédemment, nous remarquons que l'arginine en position 270 est située dans la boucle flexible permettant la fermeture de la poche de fixation du substrat accepteur après le changement de la conformation de la  $\beta$ 4GalT7 en présence du manganèse et de l'UDP-Gal. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel du motif tri-tyrosine ainsi que des arginines 226 et 270 dans le bon positionnement du xyloside et la reconnaissance du substrat accepteur.



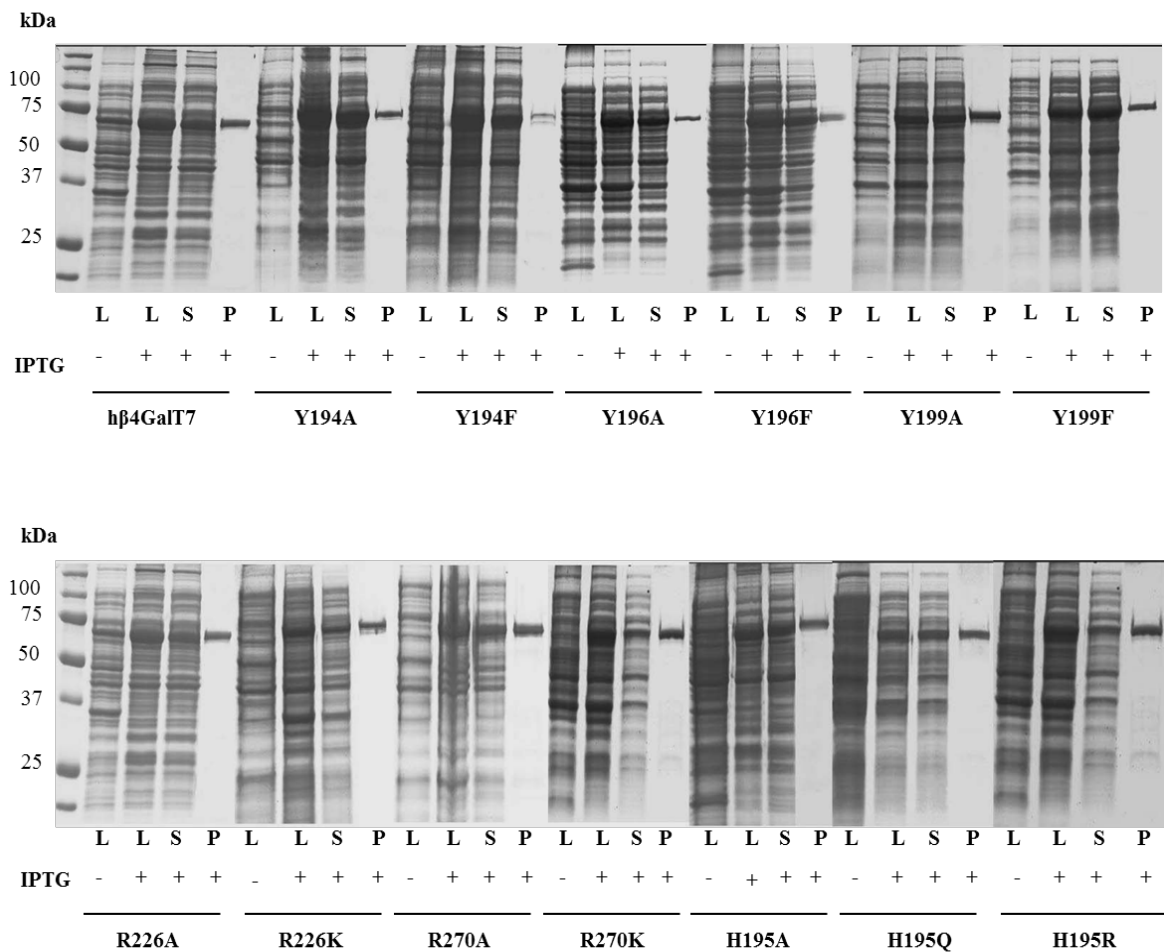
**Figure 28 : Modélisation moléculaire du site actif de la  $\beta$ 4GalT7.** Vue du site actif de la  $\beta$ 4GalT7 humaine en complexe avec le substrat donneur (UDP-Gal) et le substrat accepteur (4-MOX). D'après Tsutsui *et al.*, 2013

Pour vérifier l'importance fonctionnelle de ces résidus expérimentalement, nous allons, par mutagenèse dirigée, analyser l'impact de mutations ciblant ces positions identifiées sur l'activité enzymatique et les paramètres cinétiques de la  $\beta$ 4GalT7.

### **III- Étude *in vitro* de l'impact des mutations aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270 sur le comportement cinétique de la $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine**

#### **III.1- Expression et purification de la $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine sauvage ou mutée aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270**

Nous avons précédemment optimisé l'expression et la purification de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine sauvage à partir de bactéries *E. coli* BL21 transformées par le vecteur pET41a contenant la séquence codant notre protéine d'intérêt. Nous avons donc procédé aux mêmes étapes techniques pour exprimer et purifier les différentes enzymes mutées. Au préalable, nous avons effectué des mutations ponctuelles (conservative et non-conservative) sur les positions identifiées précédemment, par la technique de mutagenèse dirigée par PCR en utilisant le kit « QuickChange site-directed mutagenesis kit ». La mutation conservative consiste à remplacer un résidu d'acide aminé par un autre présentant une structure et des fonctions chimiques comparables dans le but de conserver les interactions permettant à l'enzyme de garder ses fonctionnalités. Au contraire, la mutation non-conservative consiste à remplacer un acide aminé par un autre qui diffère de par sa structure et ses fonctions chimiques de façon à observer l'importance du résidu étudié sur l'organisation structurale de l'enzyme et donc sur sa fonctionnalité. Le plasmide pET- $\beta$ 4GalT7 a été utilisé comme matrice avec les amorces sens et antisens qui portent le codon de la mutation d'intérêt (comme décrit dans la section Matériels et méthodes). Le niveau d'expression et de purification pour chaque enzyme mutée a été vérifié par gel SDS-PAGE et présenté en Figure 29. Globalement, le procédé a permis d'obtenir un rendement de 2 à 3 mg de protéines mutées pour 200 mL de culture bactérienne, ce qui est comparable au rendement obtenu lors de la purification de la forme sauvage de l'enzyme.



**Figure 29: Expression et purification de la GST-β4GalT7ΔNt-60 sauvage et mutée dans la bactérie.** Les protéines ont été exprimées dans la bactérie *E. coli* BL21, puis purifiées par chromatographie d'affinité sur résine Sepharose-glutathion. Les différentes fractions éluées sont ensuite analysées par SDS-PAGE. Pour chaque mutant, 25 µg de protéines pour le lysat non-induit et induit à l'IPTG, 12 µg de protéines pour le surnageant, et 3 µg pour les fractions de purification ont été déposés. Pour chaque gel, Lysat cellulaire de bactéries avant induction (L-) et après induction à l'IPTG (L+), surnageant (S) après centrifugation et fraction protéique après élution par le glutathion réduit (P).

### III.2- Détermination des paramètres cinétiques de la β4GalT7 recombinante humaine sauvage ou mutée aux positions Y194, H195, Y196, Y199, R226 ou R270 vis-à-vis de l'UDP-Gal et du 4-MOX

Afin d'évaluer l'activité spécifique (AS) de l'enzyme, nous rapportons la vitesse initiale ( $V_i$ ) de la réaction à la quantité de protéine (en moles). Pour ce faire, une gamme étalon est réalisée à partir de dilutions successives de 4-MOX allant de 0,04 à 20 µmoles. La droite obtenue est ajustée par une régression linéaire dont les paramètres sont utilisés pour calculer la quantité de produit formé après 30 min de réaction. Les réactions enzymatiques sont

réalisées dans un volume de 50  $\mu$ L en présence de 150 ng de protéine purifiée, 100 mM de tampon cacodylate (pH 7.0) contenant 10 mM d'ions  $Mn^{2+}$  soit en faisant varier la concentration de 4-MOX de 0,05 mM à 5 mM en maintenant la concentration en UDP-Gal à 1mM, soit en faisant varier la concentration en UDP-Gal de 0,05 mM à 5 mM en maintenant la concentration en 4-MOX à 4 mM (comme décrit dans la section Matériels et méthodes). Les paramètres cinétiques ( $k_{cat}$  et  $K_m$ ) de chaque mutant ainsi que de l'enzyme sauvage sont reportés dans le tableau 7.

Parmi les résultats les plus marquants, on note que la substitution de la tyrosine 194 par une alanine abolit toute activité enzymatique (Tableau 7). En outre, la substitution de cette tyrosine par une phénylalanine ne permet que la restauration d'une activité enzymatique très réduite caractérisée par une valeur de  $k_{cat}$  à hauteur de seulement 1% de celle déterminée pour la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 sauvage, tandis que les  $K_m$  vis-à-vis du 4-MOX et de l'UDP-Gal sont fortement augmentés traduisant une perte d'affinité de ce mutant pour les deux substrats (Tableau 7). Ce résultat important confirme que la présence du résidu aromatique seul à cette position ne suffit pas à restaurer l'activité de l'enzyme. La présence du groupement hydroxyle caractéristique de la tyrosine semble indispensable à la fixation du (des) substrat(s) et/ou à la catalyse enzymatique conformément aux prédictions structurales. Y194 joue donc un rôle fonctionnel déterminant.

Concernant la tyrosine en position 196, les résultats montrent que sa substitution par une alanine (mutation non-conservative) abolit l'activité enzymatique (Tableau 7). Au contraire, sa substitution par une phénylalanine (mutation conservative) restaure partiellement l'activité enzymatique. En effet, le  $k_{cat}$  est ici déterminé à hauteur de 32% de celui obtenu pour l'enzyme sauvage tandis que les valeurs de  $K_m$  pour le 4-MOX et l'UDP-Gal avec ce mutant sont augmentées de 3 et 1,5 fois respectivement, en comparaison avec ceux trouvés pour l'enzyme sauvage. Des résultats comparables ont été obtenus lors des essais réalisés impliquant la mutation de la tyrosine en position 199 (Tableau 7). Nous observons en effet, que le remplacement de cette tyrosine par une alanine entraîne une abolition de l'activité enzymatique tandis que nous observons une récupération partielle de l'activité en remplaçant Y199 par une phénylalanine. La constante  $k_{cat}$  est dans ce cas à hauteur de 80% de celle de la sauvage, et nous observons une augmentation des  $K_m$  d'un facteur 1,5 pour l'UDP-Gal et d'un facteur 2 pour le 4-MOX. De ce fait, l'efficacité enzymatique de la  $\beta$ 4GalT7 mutée en remplaçant la tyrosine par une phénylalanine diminue d'un facteur 2 par rapport à la forme



sauvage. Ensemble, ces résultats suggèrent que le caractère hydrophobe conféré par le cycle aromatique de ces tyrosines est un complément important aux liaisons hydrogènes précédemment identifiées dans le cadre de la bonne structuration du site actif de l'enzyme et finalement pour son activité. Ces résultats confirment donc le rôle crucial des trois tyrosines en position 194, 196 et 199 pour l'activité *in vitro* de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine.

Bien que H195 soit située entre les deux premières tyrosines, les mutations sur cette position affectent peu l'activité enzymatique. Le remplacement du résidu H195 par une alanine augmente la constante  $k_{cat}$  d'un facteur 1,5 par rapport à l'enzyme sauvage, ainsi que le  $K_m$  d'un facteur 2 vis-à-vis de l'UDP-Gal et du 4-MOX. L'efficacité de l'enzyme mutée (H195A) est diminuée d'un facteur 1,4 vis-à-vis de l'UDP-Gal et le 4-MOX. En substituant le résidu H195 par une glutamine, la constante  $k_{cat}$  de l'enzyme mutée n'est pas affectée. Par contre, nous observons une augmentation du  $K_m$  d'un facteur 1,5 pour l'UDP-Gal et le 4-MOX, ce qui induit une diminution de l'efficacité enzymatique d'un facteur 1,5 vis-à-vis des deux substrats. Enfin, la mutation H195 en arginine, ne modifie pas le  $k_{cat}$ , mais nous obtenons un  $K_m$  augmenté d'un facteur 1,5 pour l'UDP-Gal, avec une efficacité enzymatique diminuée d'un facteur 2 pour le substrat donneur. Par contre, nous n'observons aucun effet de cette mutation sur les paramètres enzymatiques en fonction du 4-MOX. Ensemble, ces résultats indiquent que les mutations de ce résidu n'affectent affectent peu l'activité de la  $\beta$ 4GalT7. Ces résultats sont en accord avec la prédiction moléculaire qui suggère une implication de l'atome d'azote du squelette peptidique et non de sa chaîne latérale avec le carbonyle du noyau 4-MO.

La substitution de la position R226 par une alanine affecte peu l'affinité de l'enzyme pour les substrats UDP-Gal et 4-MOX mais conduit à une réduction de 40% de la valeur de  $k_{cat}$  par rapport à celle trouvée pour l'enzyme sauvage (Tableau 7). Ceci se traduit par une diminution de 60% et 55% de l'activité enzymatique vis-à-vis du substrat donneur et accepteur respectivement. En remplaçant le résidu R226 par une lysine, le  $k_{cat}$  retrouve un niveau comparable à celui atteint par l'enzyme sauvage tandis qu'une légère augmentation du  $K_m$  pour le 4-MOX est observée. Ces données confirment un rôle possible de ce résidu dans l'interaction de l'enzyme avec le 4-MOX comme il a été précédemment suggéré par l'analyse bio-informatique.

Enfin, concernant le résidu R270, les mutations conservatives et non conservatives touchant cette position réduisent le  $k_{cat}$  de l'enzyme de moitié. Si les deux types de mutations affectent peu le  $K_m$  de l'enzyme vis-à-vis du substrat donneur, ils doublent pratiquement la valeur du  $K_m$

de l'enzyme pour le 4-MOX comparé à celle obtenue avec l'enzyme sauvage (Tableau 7). Même si le rôle structural de l'arginine 270 n'est pas encore parfaitement identifié, il s'avère être un résidu important dans la liaison de l'enzyme avec le substrat xylosidique.

Enzyme	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	UDP-Gal		4-MUX	
		$K_m$ (mM)	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )
GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60	90.5 $\pm$ 2.3	0.22 $\pm$ 0.02	425	0.35 $\pm$ 0.02	250
Y194A	ND	ND	-	ND	-
Y194F	ND	ND	-	ND	-
H195A	115.9 $\pm$ 9.7 *	0.40 $\pm$ 0.02 *	291	0.64 $\pm$ 0.02 *	180
H195Q	97.4 $\pm$ 2.4 *	0.33 $\pm$ 0.02 *	295	0.55 $\pm$ 0.02 *	177
H195R	89.6 $\pm$ 1.3	0.32 $\pm$ 0.02 *	295	0.35 $\pm$ 0.03	242
Y196A	ND	ND	-	ND	-
Y196F	30 $\pm$ 1.1 *	0.34 $\pm$ 0.06 *	88	1.06 $\pm$ 0.06 *	28
Y199A	ND	ND	-	ND	-
Y199F	72.3 $\pm$ 5.8 *	0.32 $\pm$ 0.02 *	243	0.59 $\pm$ 0.06 *	113
R226A	53.6 $\pm$ 2.0 *	0.34 $\pm$ 0.03 *	171	0.44 $\pm$ 0.05 *	112
R226K	81.1 $\pm$ 2.9 *	0.29 $\pm$ 0.02 *	282	0.46 $\pm$ 0.01 *	175
R270A	46.4 $\pm$ 0.2 *	0.27 $\pm$ 0.01 *	184	0.60 $\pm$ 0.02 *	72
R270K	48.7 $\pm$ 1.5 *	0.37 $\pm$ 0.02 *	139	0.54 $\pm$ 0.07 *	85

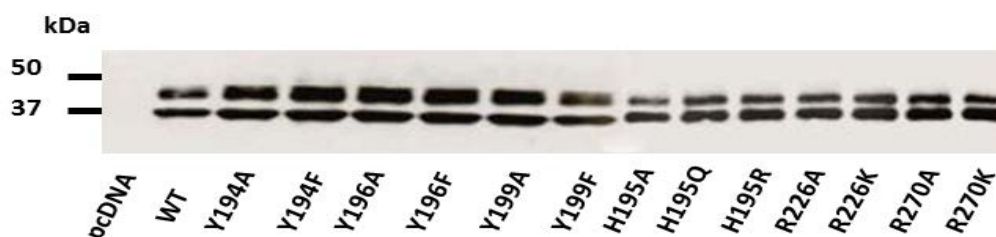
**Tableau 7: Constantes cinétiques de la GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 sauvage et mutée vis-à-vis des substrats donneur et accepteur en condition de vitesse initiale.** Utilisant 0.2  $\mu$ g de protéine purifiée GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 avec une concentration fixe en UDP-Gal (1 mM) et des concentrations croissantes de 4-MOX (0–5 mM) ou en concentration fixe de 4-MOX (5 mM) et des concentrations croissantes en UDP-Gal (0-5 mM), les paramètres cinétiques ont été déterminés par régression non-linéaire en suivant l'équation de Michaelis-Menten (logiciel SigmaPlot 12.0). Les résultats sont les valeurs moyennes de trois mesures indépendantes  $\pm$  SD sur des analyses effectuées en double. ND : indique qu'aucun paramètre cinétique ne peut être déterminé en utilisant un excès de substrat donneur et une quantité de protéine supérieure à 0,5  $\mu$ g.

Ces résultats obtenus *in vitro* mettent en évidence des résidus critiques du domaine catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine dans la spécificité de reconnaissance du substrat accepteur et donc dans l'efficacité enzymatique.

#### IV– Étude *ex vivo* de l'impact des mutations affectant la séquence de la $\beta$ 4GalT7 sur le taux de synthèse des GAGs

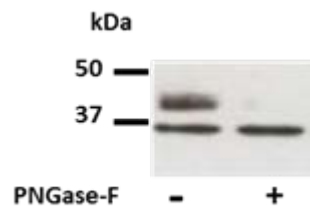
##### IV.1 – Évaluation des effets des mutations aux positions 194, 195, 196, 199, 226 et 270 sur la biosynthèse des chaînes de GAG dans les cellules CHO-pgsB618

Afin de déterminer si l'enzyme sauvage et les mutants sont capables d'initier la synthèse des GAGs à partir du 4-MOX ajouté de manière exogène aux cellules, des mutations identiques ont été réalisées sur la séquence de la  $\beta$ 4GalT7 recombinante humaine sous-clonée dans le plasmide pcDNA3.1 et chacun des mutants a été exprimé dans les cellules CHO-pgsB618 déficientes en  $\beta$ 4GalT7. Nous avons réalisé une transfection transitoire pour exprimer la  $\beta$ 4GalT7 native (membranaire) sauvage ou mutée couplée à une étiquette myc et analysé par immunoblot le niveau d'expression des protéines. Le résultat, présenté en Figure 30, confirme qu'aucune bande correspondante à la  $\beta$ 4GalT7 n'est observée pour les cellules CHO-pgsB618 transfectées avec le plasmide vide pcDNA3.1. Au contraire, une bande est présente aux alentours des 35 kDa dans les cellules transfectées par les vecteurs contenant les gènes codant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée (Figure 30).



**Figure 30: Analyse de l'expression de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage et mutée par immunoblot.** Les cellules CHO-pgsB618 ont été transfectées transitoirement par le plasmide vide (pcDNA) ou contenant le gène d'intérêt. Après 22 h d'incubation, les cellules sont récupérées, soniquées 3x10 sec sur glace et le lysat cellulaire est déposé sur gel à raison de 30  $\mu$ g de protéines/puits. Nous observons 1 bande d'environ 35 kDa correspondant à la  $\beta$ 4GalT7-myc sauvage ou mutée, ainsi qu'une deuxième bande à environ 40 kDa qui pourrait correspondre à une forme glycosylée de cette protéine.

Nous remarquons également la présence d'une deuxième bande aux environs de 40 kDa, qui pourrait correspondre à une forme glycosylée de la protéine (Figure 30). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traité un échantillon de lysat cellulaire exprimant la forme sauvage de la  $\beta$ 4GalT7 par une N-glycosidase (Figure 31). Ce traitement a permis d'éliminer cette deuxième bande et conforte l'idée que la deuxième bande correspond à une forme glycosylée de la  $\beta$ 4GalT7.



**Figure 31 : Analyse de la glycosylation de la  $\beta$ 4GalT7 dans les cellules CHO-pgsB618.** Un lysat cellulaire contenant la forme sauvage de la  $\beta$ 4GalT7 a été traité par une N-glycosidase (PNGase F) et ensuite déposé sur gel. A gauche l'échantillon non-traité (PNGase-F -), deux bandes apparaissent à  $\sim$ 35kDa et  $\sim$ 40 kDa. A droite, un échantillon traité par la PNGase-F (PNGase-F +).

Nous avons ensuite analysé l'effet des mutations sur le niveau de synthèse des chaînes de GAG en présence de concentrations croissantes en 4-MOX en mesurant le taux d'incorporation d'un précurseur radiomarqué dans les chaînes de GAG néosynthétisées, comme décrit dans la section Matériels et méthodes.

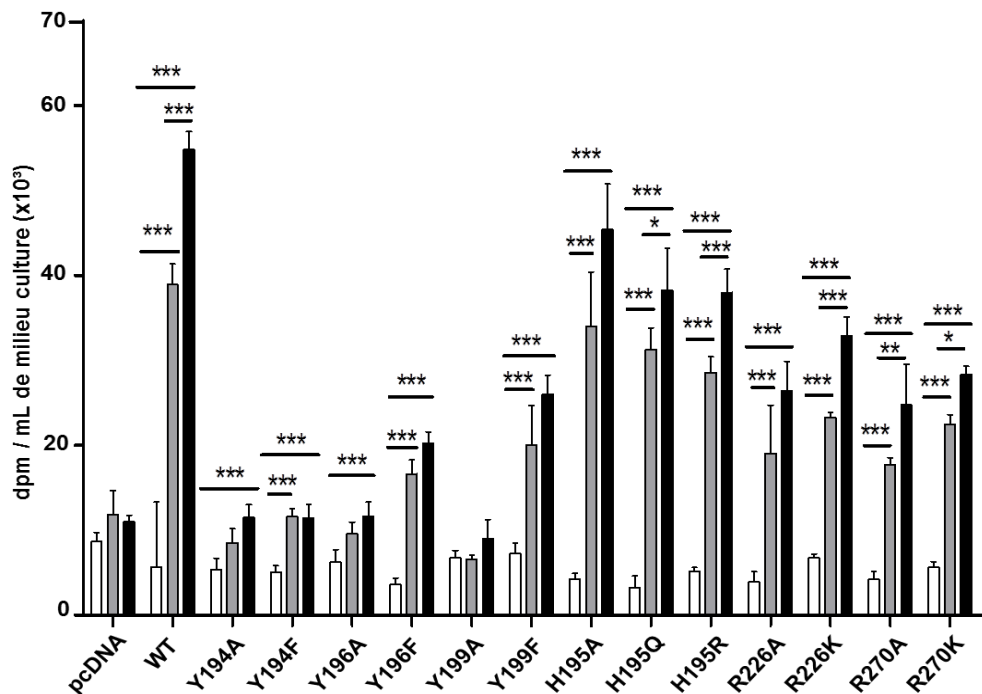
Nous remarquons d'abord que toute mutation touchant la tyrosine en position 194 abolit totalement la capacité de la  $\beta$ 4GalT7 à former des chaînes de GAG dans les cellules même à la plus forte concentration en substrat accepteur (4-MOX) (Figure 32). Concernant les tyrosines en positions 196 et 199, leur remplacement par une alanine (mutation non-conservative) réduit fortement la synthèse des chaînes de GAG dans les cellules CHO-pgsB618 déficientes en  $\beta$ 4GalT7 transfectées transitoirement par ce mutant. En revanche, les mutations conservatives Y196F et Y199F permettent tout de même d'atteindre 35% du niveau d'expression de chaînes de GAG par les cellules exprimant l'enzyme sauvage en présence de 5 ou 10  $\mu$ M de 4-MOX (Figure 32). Ensemble, ces résultats confirment les données précédemment obtenues *in vitro* et confortent clairement le rôle crucial de ces trois tyrosines dans la reconnaissance du substrat accepteur et l'activité galactosyltransférase.

Ces essais ont également été réalisés sur des mutations portant sur l'histidine en position 195 du fait de son implication potentielle dans le site de fixation du xyloside. Corroborant les données obtenues *in vitro*, les résultats *in cellulo* montrent que le niveau de synthèse des chaînes de GAG obtenu avec les cellules CHO-pgsB618 transfectées par un vecteur contenant le gène codant la  $\beta$ 4GalT7 mutée : H195A, H195Q (mutations non-conservatives) ou H195R (mutation conservative) reste comparable à celui obtenu avec celles exprimant transitoirement

la  $\beta$ 4GalT7 sauvage à toutes les concentrations de 4-MOX (Figure 32). Ce résultat confirme donc que la chaîne latérale du résidu His195 n'est pas cruciale pour le fonctionnement de l'enzyme *in cellulo*, mais ne remet pas en cause l'hypothèse qu'il soit un résidu modulant la prise en charge du 4-MOX) comme le suggèrent les données *in vitro* et le modèle structural.

Enfin les mutations touchant les arginines en position 226 ou 270 réduisent de 50% le taux de synthèse des GAGs en présence de 5 et 10  $\mu$ M de 4-MOX par rapport aux cellules exprimant l'enzyme sauvage.

Ensemble, ces résultats nous ont permis de confirmer dans un système cellulaire, les résultats obtenus précédemment *in vitro* et témoignent de l'importance des résidus étudiés pour la reconnaissance du substrat accepteur et l'activité galactosyltransférase *in cellulo*.



**Figure 32 : Analyse du taux de synthèse des chaînes de GAG en fonction de la concentration en substrat accepteur 4-MOX.** Les cellules CHO-pgsB618 déficientes sont transfectées transitoirement par la  $\beta$ 4GalT7-myc sauvage (WT) ou mutée ou par le vecteur vide pcDNA3.1 (pcDNA). 24 heures après transfection, les cellules sont incubées dans un milieu Fisher contenant du soufre 35 à raison de 10  $\mu$ Ci/mL, en présence de concentrations croissantes de 4-MOX (0, 5 et 10  $\mu$ M en blanc, gris et noir respectivement). 18 heures après le milieu est collecté, les chaînes de GAG radiomarquées sont purifiées sur une colonne Sephadex G50-Fine et quantifiées par comptage en scintillation liquide. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triple. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test *t* de student, avec \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  et \*\*\*,  $p < 0,001$  par rapport au taux de synthèse de GAGs par les cellules CHO-pgsB618 exprimant l'enzyme sauvage.

#### **IV.2- Étude de l'impact des mutations de la $\beta$ 4GalT7 sur le niveau de glycosylation de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618**

Nous avons vérifié le rôle et l'impact des résidus mutés sur la glycosylation d'une protéine *core* d'un protéoglycane-test: la décorine. Les cellules CHO-pgsB618 transfectées de façon à exprimer de façon stable la décorine puis ont été transfectées de façon transitoire par le plasmide contenant le gène codant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée. Le niveau de glycanation de la décorine de l'enzyme sauvage et de chaque mutant a été évalué par western blot (Figure 33). Nous remarquons d'abord qu'aucune bande correspondant à la protéine *core* de la décorine n'est visible (aux environs de 55 kDa) en présence de l'enzyme sauvage, indiquant que la protéine *core* de la décorine est totalement glycosylée, comme le montre la bande très intense obtenue entre 75 et 100 kDa qui correspond à la décorine glycosylée (Figure 33).

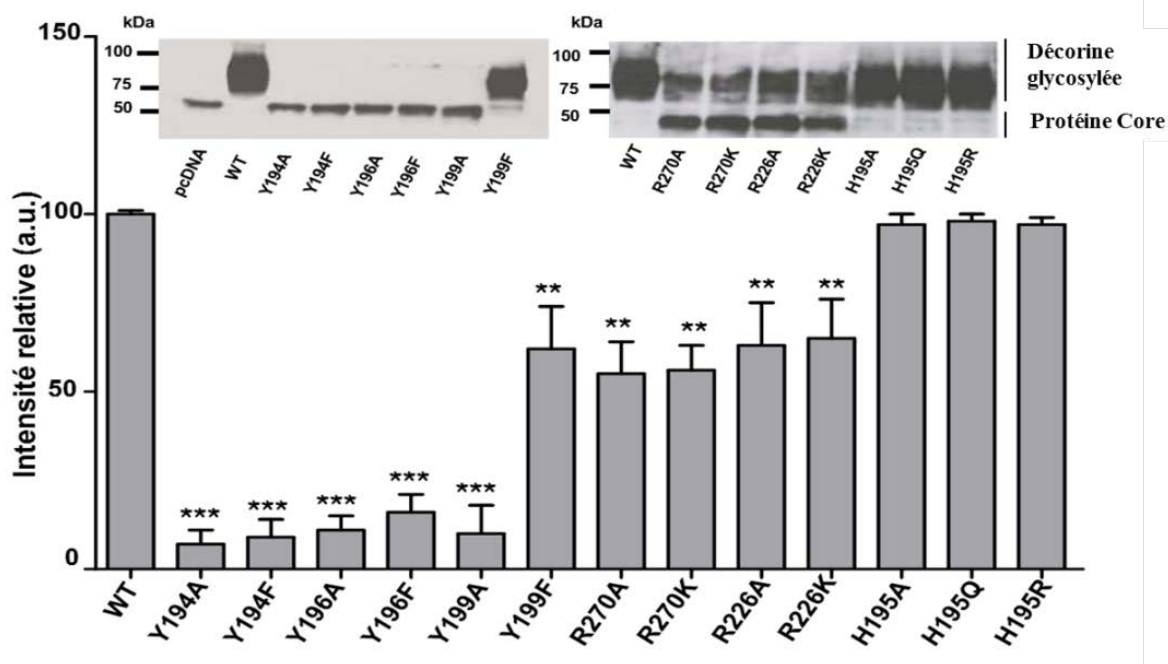
Les résultats montrent également une absence de glycosylation de la protéine *core* de la décorine en remplaçant l'une des tyrosines en position 194, 196 ou 199 par une alanine. Le niveau de glycosylation reste résiduel dans le cadre de la mutation conservative (tyrosine - phénylalanine) pour les positions 194 et 196. En revanche, dans les cellules exprimant le mutant Y199F, nous récupérons un niveau de glycosylation à hauteur de 60% de celui atteint dans les cellules exprimant l'enzyme sauvage.

Les résultats obtenus avec les cellules exprimant la  $\beta$ 4GalT7 mutée sur la position R226 ou R270 montrent que les mutations conservatives (R226K et R270K) et non-conservatives (R226A et R270A) affectant ces positions diminuent de moitié le niveau de glycosylation de la décorine. Ainsi nous observons une diminution globale de la décorine glycosylée, corrélée à une augmentation du taux de la décorine non-glycosylée (Figure 33).

Enfin, nous montrons qu'aucune des mutations portant sur la position H195 (conservatives ou non-conservatives) n'affecte le niveau de glycanation de la décorine (98% par rapport à la sauvage) dans les cellules CHO-pgsB618.

Ensemble, ces résultats confirment que les résidus identifiés précédemment par modélisation moléculaire ont un impact non seulement sur la capacité de prise en charge du substrat exogène (4-MOX) par l'enzyme mais également sur la capacité des cellules à synthétiser des chaînes de GAG sur les protéines porteuses des PGs. Ainsi, la combinaison des approches utilisées met en évidence le rôle structural et fonctionnel de plusieurs résidus d'acides aminés régissant l'organisation du site de fixation du substrat accepteur de la  $\beta$ 4GalT7 qui seront pris

en compte pour la conception d'effecteurs à visée thérapeutique ciblant spécifiquement cette enzyme.



**Figure 33 : Effet de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée sur la glycosylation de la protéine core de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618.** Les cellules exprimant de façon stable la décorine recombinante humaine ont été transfectées par le plasmide codant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ou mutée. 48 heures après transfection, le niveau de la glycosylation de la décorine est quantifié par immunoblot comme décrit dans Matériels et méthodes. L'intensité des bandes a été quantifiée pour chaque condition en utilisant le logiciel Image J, et la valeur est exprimée en unité arbitraire (u.a). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test t de student avec : \*\*,  $p < 0,01$  et \*\*\*,  $p < 0,001$  vis-à-vis de la glycosylation de la décorine dans les cellules exprimant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage.

## V- Inhibition de l'activité galactosyltransférase de la $\beta$ 4GalT7 par des xylosides modifiés dans des conditions *in vitro* et *in cellulo*

En prenant en compte les données précédentes, nous avons entrepris le design de xylosides modifiés dans le but d'inhiber l'activité de la  $\beta$ 4GalT7. Les premières modifications portent sur la position 4 du xylose (position-clé pour la catalyse enzymatique *i.e.* transfert du galactose) en substituant le groupement OH par un hydrogène ou bien un fluor. De plus ayant montré l'importance potentielle du groupement carbonyle de l'aglycone du 4-MOX par interaction avec H195, nous avons décidé de comparer l'influence de deux aglycones différentes, la 4-methylumbellifénone (4-MO) et le naphthyl. Les molécules ainsi proposées sont : naphthyl-4-deoxy- $\beta$ -D-xylopyranoside (4H-Xyl-NP), 4-methylumbelliferyl-4-deoxy- $\beta$ -D-xylopyranoside (4H-MOX), 4-methylumbelliferyl-4-fluoro- $\beta$ -D-xylopyranoside (4F-MOX) (Figure 34). Ces

xylosides modifiés ont été testés *in vitro* et *in cellulo* en compétition avec le substrat exogène de la  $\beta$ 4GalT7 utilisé dans ces travaux : le 4-MOX.

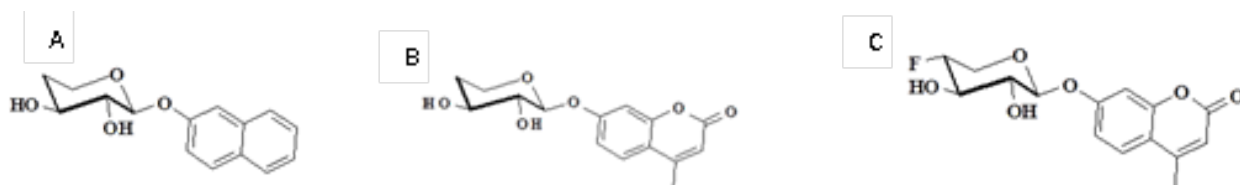


Figure 34: Structure chimique des xylosides modifiés. A: 4H-Xyl-NP, B: 4H-MOX, C: 4F-MOX

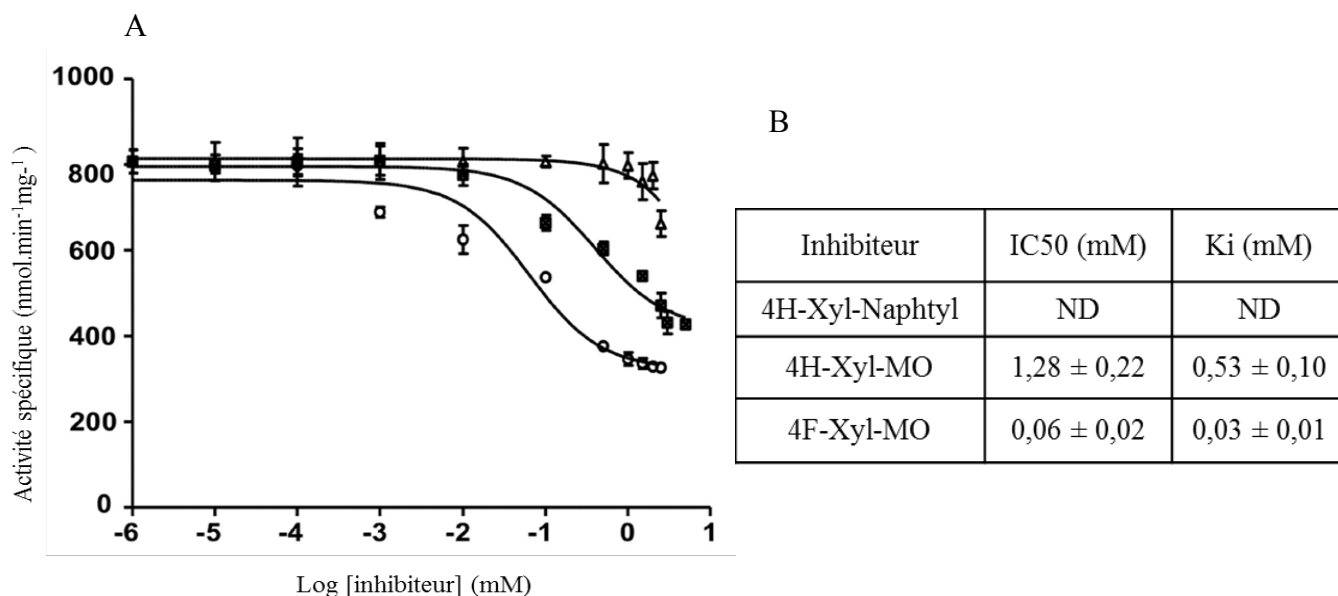
### V.1- Evaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur l'activité galactosyltransférase *in vitro*

Les xylosides modifiés en position 4 ont été testés en compétition avec le 4-MOX *in vitro* afin de déterminer leur constante d'inhibition ( $K_i$ ), en utilisant 0,2  $\mu$ g de protéines purifiées incubées en présence de 0,5 mM de 4-MOX et 1 mM d'UDP-Gal avec des concentrations croissantes en inhibiteur allant de 0 à 5 mM. Les produits de la réaction sont ensuite quantifiés par HPLC en phase inverse comme décrit dans la section Matériels et méthodes.

Les résultats des essais d'inhibition *in vitro* montrent que le 4H-Xyl-NP n'a pas d'effet inhibiteur vis-à-vis du 4-MOX (Figure 35A) tandis que le 4H-Xyl-MO inhibe légèrement l'activité enzymatique avec une  $IC_{50}$  égale à  $1,28 \pm 0,22$  mM correspondant à un  $K_i$  égal à  $0,53 \pm 0,08$  mM suivant l'équation de Cheng-Prusoff (Cheng-Prusoff 1973).

Enfin, le 4F-MOX réduit fortement l'activité de l'enzyme sauvage *in vitro* avec une  $IC_{50}$  de  $0,06 \pm 0,02$  mM correspondant à un  $K_i$  de  $0,03 \pm 0,01$  mM déterminé comme précédemment en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff (Figure 35B).



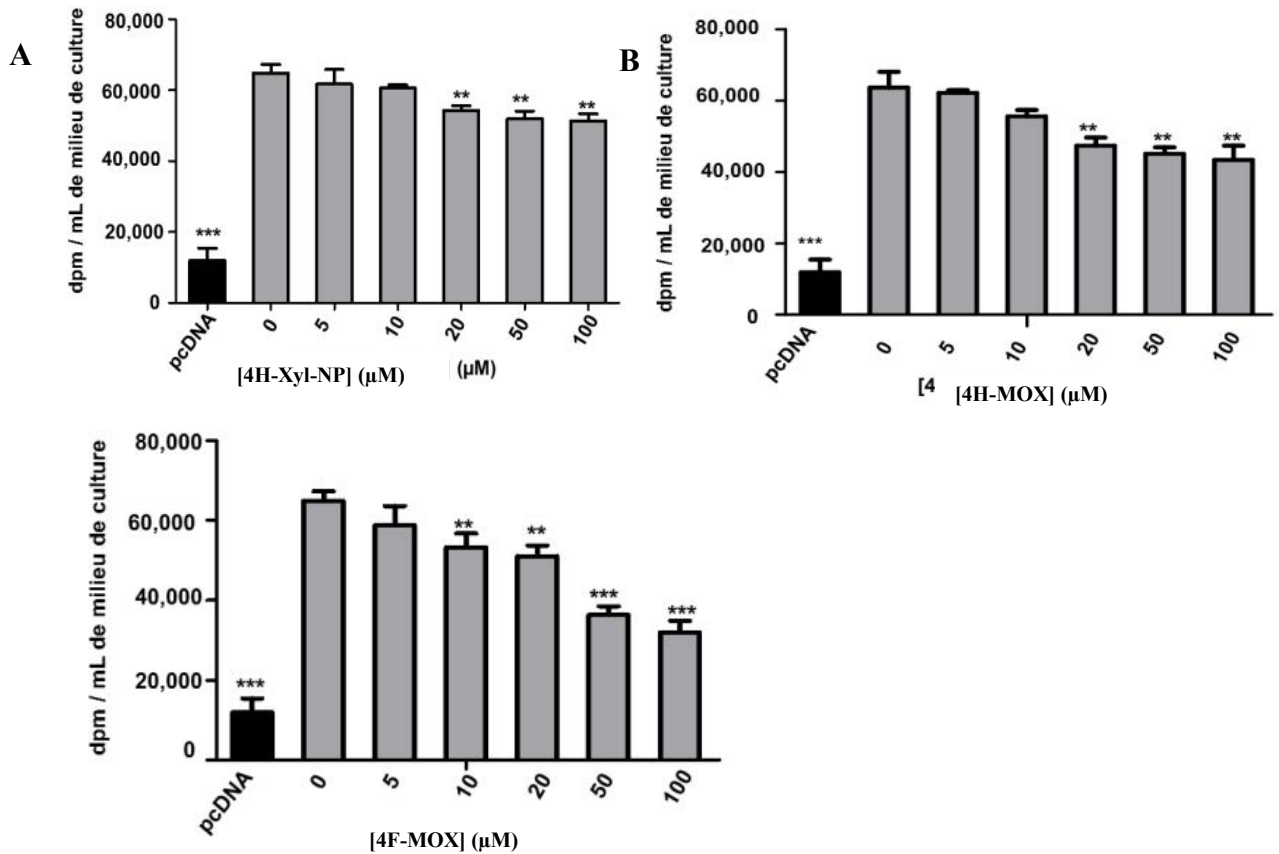


**Figure 35 : Paramètres cinétiques de l'inhibition de la  $\beta$ 4GalT7 par les xylosides modifiés.** **A :** graphe représentant les courbes d'inhibition de l'activité spécifique de la  $\beta$ 4GalT7 en présence de concentrations fixes en UDP-Gal (1 mM) et en 4-MOX (0,5 mM) et des concentrations croissantes allant de 0 à 5 mM de : 4H-Xyl-NP (triangle), 4H-MOX (carré) ou 4F-MOX (rond). **B :** Détermination de la constante d'inhibition ( $IC_{50}$ ) de la  $\beta$ 4GalT7 en présence des xylosides modifiés, ainsi de son  $K_i$  en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff. La réaction a été réalisée en utilisant 0.2  $\mu$ g de protéine purifiée GST- $\beta$ 4GalT7 $\Delta$ Nt-60 à une concentration fixe en UDP-Gal (1 mM) et en 4-MOX (0.5 mM) et des concentrations croissantes de chaque inhibiteur (0-5 mM). Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide de logiciel GraphPad Prism 5. Le résultat est la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. ND : non déterminable.

## V.2- Évaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur le taux de biosynthèse des chaînes de GAG dans les cellules CHO-pgsB618

Nous avons également vérifié la capacité des xylosides modifiés à inhiber la biosynthèse des chaînes de GAG initiée à partir du 4-MOX *in cellulo*.

Les résultats montrent qu'à 100  $\mu$ M de 4H-Xyl-NP, nous obtenons une réduction de 7% du taux de synthèse de chaînes de GAG. Si en présence de 100  $\mu$ M de 4H-MOX nous observons une réduction de 20 % du taux de chaîne de GAGs néosynthétisées, en utilisant le 4F-MOX à la même concentration le taux est réduit de 45 % (Figure 36).



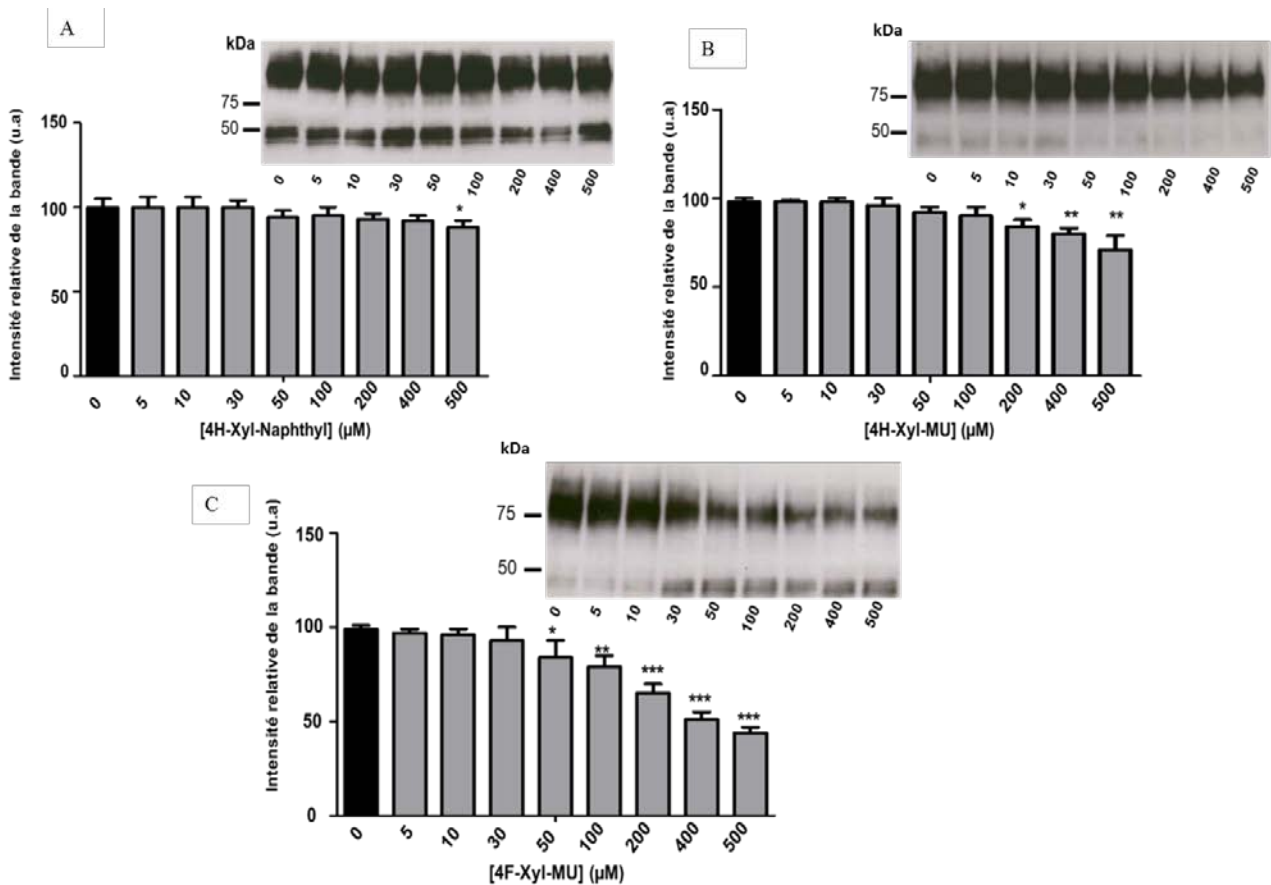
**Figure 36: Inhibition de la synthèse des chaînes de GAG sur les cellules CHO-pgsB618.** Les cellules CHO-pgsB618 transfectées par le plasmide permettant l'expression transitoire de la  $\beta$ 4GalT7 sauvage ont été incubées avec 5  $\mu$ M de 4-MUX et de 10  $\mu$ Ci de  $\text{Na}_2 [^{35}\text{SO}_4^{2-}]$ , en présence de 4H-Xyl-NP (A), 4H-MOX (B), et 4F-MOX (C). Les cellules transfectées par le vecteur pcDNA (vide) ont été considérées comme contrôle négatif.

### V.3- Évaluation de l'effet inhibiteur des xylosides modifiés sur la glycosylation de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618 exprimant la $\beta$ 4GalT7

La capacité des xylosides modifiés à inhiber la glycosylation de la décorine a également été testée.

Pour ce faire, les cellules CHO-pgsB618 exprimant d'une façon stable la protéine core de la décorine humaine sont transfectées transitoirement par le vecteur contenant la séquence codant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage. Le taux de glycosylation de la décorine est ensuite quantifié en fonction de la concentration de chaque inhibiteur en utilisant le logiciel Image J (comme décrit dans la section Matériels et méthodes). Nous n'observons pas de diminution du niveau de glycosylation de la protéine *core* de la décorine en utilisant le composé 4H-Xyl-NP alors que le xyloside déhydroxylé 4H-MOX inhibe jusqu'à 20% de la glycanation de la décorine à

une concentration de 0,5 mM (Figure 37 A et B). Le dérivé fluoré 4F-MOX inhibe quant à lui la glycanation de la décorine à hauteur de 60% de celle obtenue avec l'enzyme sauvage à la même concentration (Figure 37C).



**Figure 37: Inhibition de la glycosylation de la décorine par des xylosides exogènes.** Les cellules CHO-pgsB618 exprimant de façon stable la protéine core de la décorine, sont co-transfectées par le plasmide permettant contenant la séquence codant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage. 24 heures après transfection, les cellules sont traitées pendant 48 heures par le 4H-Xyl-NP (A), ou le 4H-MOX (B), ou le 4F-MOX (C). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes, analysées statistiquement par le test *t* de student \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## VI- Effets cellulaires du 4F-MOX sur les lignées cancéreuses

Nous avons montré ci-dessus que le 4F-MOX inhibe de façon efficace la synthèse des chaînes des GAG dans les cellules CHO-pgsB618 exprimant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage recombinante humaine. Nous avons ensuite souhaité déterminer quelles sont les conséquences de l'inhibition de la biosynthèse des GAGs sur les propriétés cellulaires de lignées cancéreuses, en premier lieu en terme de prolifération. En effet, les chaînes de GAGs, notamment les héparane-sulfates jouent le rôle de co-récepteurs des facteurs de croissance et cytokines. Dans

le cas des FGF et de leurs récepteurs (FGFR), ils forment un complexe ternaire, régulant la transduction du signal médiée par ces facteurs de croissance et par conséquent influençant le processus tumoral (Iozzo *et al.*, 2009). Par ce mécanisme et d'autres, les chaînes de GAGs des PGs peuvent moduler des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la migration cellulaire et autres processus importants au cours du processus tumoral, comme l'angiogenèse. Une expression anormale des GAGs peut ainsi promouvoir le caractère agressif et invasif d'une tumeur.

Dans ce contexte, nous avons souhaité en premier lieu évaluer la capacité du 4F-MOX à moduler la prolifération cellulaire au niveau de lignées cellulaires humaines tumorales. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec les cellules MDA-MB231 qui sont issues d'une tumeur mammaire métastatique avec épanchement pleural. Cette lignée exprime le récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'EGFR, impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire via l'activation de la voie des MAP-kinases (Bates *et al.*, 1990). Ce signal d'activation est renforcé suite à l'interaction du récepteur de l'EGF avec les PGs. Parmi différents mécanismes, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la synthèse de chaînes de GAG pourrait impacter négativement l'interaction EGF/EGFR/PG et permettrait donc de réduire la migration et la prolifération de ces cellules en diminuant le signal d'activation impliquant ce récepteur.

Dans ces essais, nous utiliserons également, les cellules SW1353 issues de chondrosarcome humain qui est une tumeur maligne rare mais pour laquelle aucun traitement efficace n'est connu à ce jour.

Nous avons initié notre étude par une évaluation de l'effet cytotoxique du 4F-MOX en comparaison avec le 4-MOX sur les deux lignées cellulaires cancéreuses considérées. Nous avons ensuite analysé la capacité de la 4-MOX à initier la synthèse des chaînes de GAGs dans chacune des lignées et celle du dérivé 4-fluoré à l'inhiber. Enfin, nous avons comparé l'effet de chacun des deux analogues sur la prolifération cellulaire.

### **VI.1- Étude de l'effet cytotoxique du 4-MOX et du 4F-MOX sur les lignées cellulaires : CHO-pgsB618, MDA-MB231 et SW1353.**

Afin de déterminer la concentration maximale non toxique pour utiliser le 4F-MOX et le 4-MOX dans nos conditions expérimentales, nous avons réalisé un test de cytotoxicité cellulaire sur les deux lignées cellulaires cancéreuses. Brièvement, nous incubons pendant 48 heures les

cellules tumorales (MDA-MB231 ou SW1353) en présence de concentrations croissantes (0-500  $\mu\text{M}$ ) de 4-MOX ou de 4F-MOX. Ensuite, nous déterminons la viabilité cellulaire par comptage cellulaire (à l'aide d'un compteur automatique de cellules, BioRad TC10<sup>TM</sup>). Les cellules CHO-pgsB618 ont parallèlement été traitées de la même façon afin d'établir un comparatif. Les résultats sont présentés dans le tableau 8. Les résultats montrent que les deux lignées cellulaires tolèrent le 4F-MOX ou le 4-MOX jusqu'à 400  $\mu\text{M}$ , puisque à ce niveau de concentration, le taux de viabilité cellulaire est supérieur à 92%. Néanmoins, une diminution de 20 à 30 % de la viabilité cellulaire est observée pour des concentrations plus importantes en 4F-MOX (500  $\mu\text{M}$ ), contrairement au 4-MOX qui apparaît moins toxique pour cette même concentration (Tableau 8). Concernant les cellules CHO-pgsB618, nous observons une cytotoxicité moins importante à des concentrations plus élevées de 4-MOX tandis qu'une toxicité modérée est observée dès 500  $\mu\text{M}$  de 4F-MOX.

Ainsi, nous décidons pour la suite de ces travaux d'utiliser une concentration de 300  $\mu\text{M}$  de 4-MOX ou de 4F-MOX, puisqu'à cette concentration la viabilité cellulaire est supérieure à 95%. Nous nous assurons ainsi que les effets observés sur la prolifération cellulaire de ces lignées ne seront pas dus à la toxicité de ces molécules.

			Concentrations ( $\mu\text{M}$ )						
			0	50	100	200	300	400	500
Viabilité cellulaire (%)	MDA-MB231	4-MOX	94,3 $\pm$ 4,0	95,3 $\pm$ 0,6	96,0 $\pm$ 1,0	96,7 $\pm$ 0,6	97,7 $\pm$ 1,5	94,0 $\pm$ 1,0	88,3 $\pm$ 0,6 **
		4F-MOX	97,3 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 0,6	95,7 $\pm$ 0,6	96,3 $\pm$ 1,5	96,3 $\pm$ 0,6	92,3 $\pm$ 1,6 *	73,6 $\pm$ 1,5 ***
	SW1353	4-MOX	97,3 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 0,6	97,3 $\pm$ 1,2	96,3 $\pm$ 0,6	97,7 $\pm$ 0,6	95,7 $\pm$ 1,5	90,7 $\pm$ 1,2 **
		4F-MOX	95,3 $\pm$ 0,6	95,7 $\pm$ 0,6	94,3 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 1,5	95,0 $\pm$ 2,0	92,7 $\pm$ 1,2	68,3 $\pm$ 1,5 ***
	CHO-pgsB618	4-MOX	98,3 $\pm$ 0,6	96,7 $\pm$ 0,6	96,0 $\pm$ 1,0	95,3 $\pm$ 0,6	97,3 $\pm$ 0,5	95,3 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 1,2
		4F-MOX	95,3 $\pm$ 1,1	96,0 $\pm$ 1,0	94,6 $\pm$ 1,2	96,7 $\pm$ 0,5	94,0 $\pm$ 1,0	93,6 $\pm$ 0,6	89,3 $\pm$ 1,5 **

**Tableau 8: Évaluation de la cytotoxicité du 4-MOX et du 4F-MOX sur lignées cellulaires (MDA MB231, SW 1353 et CHO-pgsB618).** Les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes du 4-MOX ou du 4F-MOX pendant 48 heures. Ensuite les cellules ont été récupérées et comptées en utilisant un colorant vital (bleu de trypan). Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été déterminés à partir de 3 comptages sur 2 cultures cellulaires indépendantes, analysées statistiquement par le test *t* de student \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

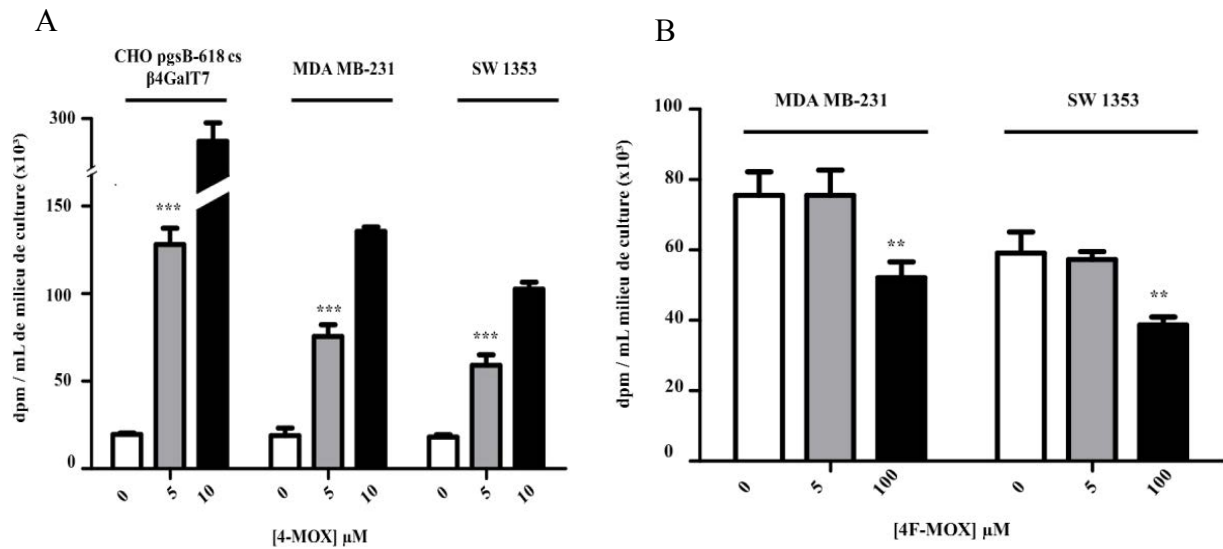
## **VI.2- Évaluation de la capacité du 4F-MOX à inhiber la synthèse des chaînes de GAG dans les cellules tumorales MDA MB-231 et SW1353**

Avant de vérifier la capacité d'inhibition du 4F-MOX sur la synthèse des chaînes de GAG sur les deux lignées cellulaires humaines cancéreuses, il était d'abord nécessaire d'évaluer le niveau de synthèse des chaînes de GAG par ces lignées à partir de 4-MOX. Pour évaluer la capacité inhibitrice d'une molécule, il est impératif de déterminer la concentration optimale en substrat qui permettra aux cellules de synthétiser un taux suffisant de chaînes de GAG qui soit détectable même après inhibition.

Le taux de synthèse des chaînes de GAG a été suivi grâce à la méthode d'incorporation du soufre 35 radioactif (comme décrit dans la section Matériels et méthodes). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant les cellules CHO-pgsB618 exprimant la  $\beta$ 4GalT7 sauvage. Nous observons que le taux de synthèse des chaînes de GAG en absence de 4-MOX est bas. Sans 4-MOX, le taux de synthèse des chaînes de GAG extracellulaires ne serait pas suffisant pour la réalisation des essais de compétition/inhibition utilisant le 4F-MOX. A partir de 5  $\mu$ M de 4-MOX la synthèse de chaînes de GAG atteint un niveau suffisant ( $> 75000$  dpm/mL de milieu de culture) pour la réalisation des essais de compétition/inhibition entre les deux xylosides (fluoré ou non) dans les cellules MDA-MB231 et SW1353, quoique la quantité des chaînes de GAG produite par ces cellules reste inférieure à celle produite par les CHO-pgsB618 sur exprimant d'une façon stable la  $\beta$ 4GalT7 recombinante. Nous observons une augmentation du taux de synthèse des chaînes de GAG dans les trois lignées cellulaires testées en fonction de la concentration en 4-MOX (Figure 38). Cette augmentation est 2 fois supérieure dans les CHO-pgsB618 comparée aux MDA MB-231 en utilisant 10  $\mu$ M de 4-MOX, qui produisent 25% de plus de chaînes de GAG que les SW1353 en présence de la même concentration de substrat (Figure 38A). Nous décidons donc d'utiliser une concentration de 5  $\mu$ M de 4-MOX pour les tests de compétition/inhibition en présence du 4F-MOX.

Dans le but d'évaluer la capacité du 4F-MOX à inhiber la synthèse des chaînes de GAG dans les lignées cellulaires cancéreuses, les cellules SW1353 et MDA-MB231 ont été mises en culture, en présence de 5  $\mu$ M de 4-MOX et de 0, 5 et 100  $\mu$ M de 4F-MOX. Les résultats montrent que 5  $\mu$ M de 4F-MOX ne présente aucun effet sur le taux des chaînes de GAG synthétisé dans les deux lignées cellulaires. En revanche, en présence de 100  $\mu$ M de 4F-MOX, le taux de synthèse des chaînes de GAG chute de 30% (Figure 38B). Ces résultats montrent

que le 4F-MOX à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  diminue de 30% le taux des chaînes de GAG initiées sur le 4-MOX (5  $\mu\text{M}$ ) dans les cellules cancéreuses (MDA MB-231 et SW1353).



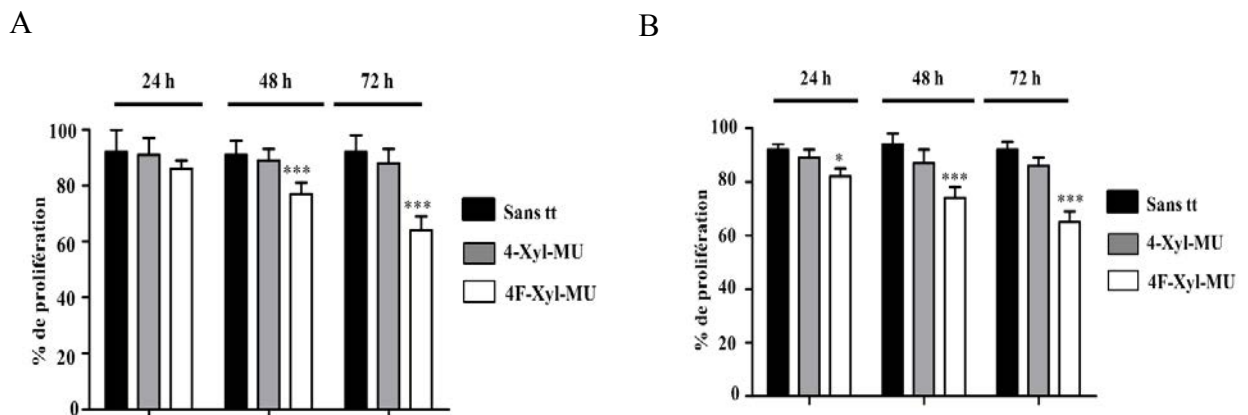
**Figure 38: Quantification des chaînes de GAG néosynthétisées dans les cellules MDA-MB231 et SW1353.** A : Les cellules CHO-pgsB618 exprimant de façon stable la  $\beta 4\text{GalT7}$  sauvage, les MDA-MB231 et les SW1353 sont incubées dans un milieu Fisher contenant du soufre 35 à raison de 10  $\mu\text{Ci/mL}$ , en présence de concentrations croissantes de 4-MOX (0 à 10  $\mu\text{M}$ ). 18 heures après, le milieu est collecté, les chaînes de GAG radiomarquées sont purifiées sur une colonne Sephadex G50-Fine et quantifiées sur un compteur à scintillation liquide.

B : le même protocole expérimentale utilisé en A est répété, en utilisant 5  $\mu\text{M}$  de 4-MOX mais en présence ou non de concentrations croissantes de 4F-MOX (0 à 100  $\mu\text{M}$ ). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes, analysées statistiquement par le test  $t$  de student \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

### VI.3- Étude de l'effet du 4F-MOX sur la prolifération des cellules cancéreuses

Nous avons montré que dans nos conditions expérimentales, 100  $\mu\text{M}$  de 4F-MOX sont capables d'inhiber la synthèse des chaînes de GAG en présence de 5  $\mu\text{M}$  de 4-MOX utilisé comme amorce exogène de la biosynthèse, mais également celle des GAGs des PGs qui sont de véritables facteurs moléculaires impliqués dans le caractère invasif de lignées cellulaires tumorales (Okolicsanyi *et al.*, 2014). Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer si le 4F-MOX est capable de réduire la prolifération de cellules tumorales en relation avec ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de la  $\beta 4\text{GalT7}$ . Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser le marquage à la CFSE (*CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*) pour évaluer l'effet du xyloside fluoré sur la prolifération cellulaire (comme décrit dans la section Matériels et méthodes). Les cellules MDA-MB 231 ou SW1353 sont tout d'abord chacune traitées (ou non) avec 300  $\mu\text{M}$  de 4-MOX ou de 4F-MOX. La prolifération cellulaire sera suivie après 24, 48 et 72 heures de culture par cytométrie en flux. Nous n'observons pas d'inhibition

significative de la prolifération après 24, 48 et 72 heures d'incubation en absence de traitement ou en présence de 4-MOX (Figure 39). En revanche, une diminution de 7% et de 11% de la prolifération des cellules SW1353 et MDA-MB 231 est respectivement observée après 24 heures de traitement par le 4F-MOX. Cette inhibition de la prolifération est plus importante après 48 heures de traitement (15% pour les SW1353 et 20% pour les MDA-MB 231) tandis qu'au-delà de 72 heures de culture en présence de 300  $\mu$ M de 4F-MOX, nous observons une diminution de 30% de la prolifération des cellules SW1353 et les MDA-MB 231, par rapport aux cellules non traitées (Figure 39). Nous pouvons également noter qu'après 72h de culture en présence de 4-MOX, nous observons une légère tendance à la diminution de la prolifération des cellules SW1353 et les MDA-MB 231, mais qui reste toutefois non significative.



**Figure 39: Evaluation de l'inhibition de la prolifération cellulaire par le 4F-MOX.** Après un marquage fluorescent des cellules par la CFSE, les cellules SW1353 (A) et MDA-MB231 (B), sont traitées pendant 24, 48 ou 72 heures par 300  $\mu$ M du 4-Xyl-MU ou 4F-Xyl-MU ou en présence de DMSO. La prolifération cellulaire est évaluée par cytométrie en flux. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes, analysées statistiquement par le test *t* de student, \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ces résultats montrent que le 4F-MOX : (1) n'est pas cytotoxique à des concentrations inférieures à 400  $\mu$ M, (2) diminue la synthèse des chaînes de GAG dans les cellules tumorales MDA-MB 231 et SW1353 à une concentration de 100  $\mu$ M et (3) réduit significativement la prolifération cellulaire des deux lignées cancéreuses à une concentration de 300  $\mu$ M.



# *Discussion*

Les PGs sont des macromolécules hydrophiles majoritairement situées à la surface des cellules, dans la matrice extracellulaire, et dans certains cas intracellulaires voire circulantes. Ils sont formés d'un tronc protéique appelé protéine core sur lequel sont greffées les chaînes de GAG. Les GAGs sont des longues chaînes non ramifiées, composées d'unités disaccharidiques, qui sont assemblées et maturées sous l'action de plusieurs enzymes, les glycosyltransférases (GTs) et les sulfotransférases (STs). Les GAGs régulent de multiples processus physiopathologiques tels que la migration et la prolifération cellulaire notamment en modulant les voies de signalisation impliquant les facteurs de croissance comme le FGF ou l'EGF (Murakami et al, 2008). Une perturbation dans la synthèse des chaînes de GAGs peut de plus être à l'origine de maladies génétiques comme le Syndrome d'Ehlers-Danlos (Miyake *et al.*, 2014), de pathologies dégénératives (Cui *et al.*, 2013) et cancéreuses (Nikitovic *et al.*, 2014). Les GTs sont des enzymes classées en 47 familles sur la base de leur séquence en acides aminés et de leur spécificité de substrat (Campbell *et al.*, 1998). Elles catalysent le transfert d'un monosaccharide d'un substrat donneur sur un autre saccharide, une protéine, un lipide ou un ADN, permettant la génération d'une grande diversité de (poly)saccharides et de glyco-conjugués. Selon le type de GT, la réaction de glycosylation impliquera l'inversion ou la rétention de la stéréochimie de la position C1 du sucre donneur. Comprendre le mécanisme moléculaire des GTs au moyen d'études structurales et fonctionnelles, permettra de mieux cerner leurs fonctions biologiques et d'identifier les enzymes impliquées dans différents processus pathologiques dans l'objectif de synthétiser des molécules les ciblant à visée thérapeutique (Varki *et al.*, 2009). Parmi les GTs impliquées dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs, la  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase 7 humaine ( $\beta$ 4GalT7) constitue une cible particulièrement pertinente de par son implication dans les étapes précoces de la biosynthèse des GAGs et sa capacité à initier cette synthèse à partir de substrats oligosaccharidiques exogènes (Siegbahn *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, mes objectifs de thèse consistaient :

- à identifier des résidus d'acides aminés clés impliqués dans l'organisation du site de fixation et dans la reconnaissance de substrats accepteurs xylosidiques exogènes ou naturels (glycopeptidiques), et à mieux comprendre le mécanisme moléculaire de prise en charge des substrats xylosidiques par la  $\beta$ 4GalT7 humaine.
- à proposer de nouvelles structures chimiques potentiellement bioactives, inhibiteurs xylosidiques à visée thérapeutique ciblant spécifiquement la  $\beta$ 4GalT7, grâce aux

connaissances obtenues au niveau de l'organisation structurale du site de fixation du substrat accepteur.

- à évaluer l'effet des meilleurs inhibiteurs sélectionnés, sur la cytotoxicité et la prolifération cellulaire de lignées cancéreuses.

Afin de cerner l'importance structurale qui sous-tend le rôle clé des résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat accepteur, nous avons entrepris la modélisation du site de fixation du substrat xylosidique de la  $\beta$ 4GalT7 humaine en se basant sur la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ 4GalT7 humaine établie par Tsutsui *et al.* (2013). Nous avons parallèlement effectué une étude fonctionnelle qui a consisté à réaliser des mutations conservatives et non conservatives sur les résidus prédits du site actif *i.e.* Y194, Y196, Y199, H195, R226 et R270. Les résultats montrent clairement que la substitution des résidus Y194, Y196 ou Y199 par une alanine (1) abolit toute activité enzymatique *in vitro*, (2) inhibe la synthèse des chaînes de GAG à partir du 4-MOX dans un modèle cellulaire, et (3) réduit la glycosylation de la protéine core de la décorine *in cellulo*. En revanche, si la substitution du résidu Y194 par une phénylalanine ne permet pas de récupérer une activité galactosyltransférase optimale *in vitro* et *in cellulo*, celle effectuée sur les positions Y196 ou Y199 permet, en utilisant un substrat exogène (4-MOX), de récupérer partiellement l'activité galactosyltransférase de la  $\beta$ 4GalT7, bien que le niveau de glycosylation de la décorine reste bas pour ces dernières mutations. Nous confirmons donc que l'acide aminé Y194 est un résidu-clé pour l'organisation structurale du site de fixation du substrat accepteur et qu'outre sa chaîne latérale aromatique, la présence du groupement hydroxyle de la tyrosine est indispensable à la fonctionnalité enzymatique. Les données du modèle moléculaire mettent d'ailleurs en évidence une interaction entre l'hydroxyle du cycle aromatique de la tyrosine 194 et le groupement 4-methylumbelliferyl du 4-MOX. Nous montrons, en outre que la Y196 n'est probablement pas impliqué dans une interaction directe avec le substrat, puisque que le cycle aromatique semble suffisant à cette position pour stabiliser l'ensemble dans une conformation active. Ceci corrobore les données issues de notre modèle moléculaire montrant que ce résidu participe à la constitution d'une poche hydrophobe avec les résidus Y194, Y199 et W224 à l'entrée du site de fixation du substrat accepteur stabilisée par des liaisons hydrogènes avec le résidu D229 qui a son tour, interagit avec l'atome O<sub>2</sub> du xylose. Ces données complètent les données disponibles sur la structure tridimensionnelle précédemment établies en 2013 par Tsutsui *et al.*, (2010). Enfin, nous montrons que la présence du noyau aromatique du résidu Y199 est

suffisant pour maintenir l'activité catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro*. D'après notre modèle moléculaire la tyrosine 199 serait positionnée à proximité des deux tyrosines 194 et 196 conférant au site de fixation du xylose un caractère hydrophobe très prononcé en faveur d'interactions de *stacking* avec l'aglycone du substrat exogène. Les mutations conservatives et non-conservatives portant sur l'H195 n'ont pas montré d'effet significatif sur l'activité glycosyltransférase de la  $\beta$ 4GalT7 aussi bien *in vitro* qu'*in cellulo*. Toutefois, nous prédisons par modélisation moléculaire que l'atome d'azote du squelette peptidique de la chaîne principale du résidu H195 pourrait être impliqué dans une liaison hydrogène avec le groupement MO du 4-MOX, ce qui expliquerait le meilleur effet inhibiteur du 4H-Xyl-MO en comparaison avec celui du 4H-Xyl-NP. Il en serait de même pour expliquer la meilleure prise en charge du 4-MOX par rapport au xylose-naphtyl. Concernant le résidu R226, sa substitution par une alanine ou une lysine, perturbe l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* et *in cellulo* sans pour autant drastiquement affecter l'efficacité de prise en charge des substrats donneur et accepteur de l'enzyme. Or, le modèle moléculaire suggère que R226 interagit avec l'oxygène en position 3 du xylose par l'intermédiaire de l'atome d'azote du squelette peptidique principal. En s'appuyant sur le modèle moléculaire, l'arginine 226 articule une région hydrophobe, riche en cycles aromatiques <sup>221</sup>FWGWG<sup>225</sup> contenant le résidu W224 (interagissant avec le groupement pyrophosphate de l'UDP-Gal) avec la région polaire <sup>227</sup>EDDE<sup>230</sup> contenant des résidus acides impliqués dans la fixation du xylose et la réaction de transfert (Talhaoui *et al.*, 2010). Ainsi R226, bien que non cruciale pour la fixation du 4-MOX, pourrait être impliquée dans le réarrangement du site de fixation du xylose après la fixation du cofacteur métallique (manganèse) et de l'UDP-Gal et participerait ainsi au bon positionnement du substrat accepteur dans sa poche de fixation. Nous avons aussi étudié le rôle fonctionnel du résidu R270 du fait de son implication dans la forme progéroïde du Syndrome d'Ehlers-Danlos (SED). La substitution de cet acide aminé par une alanine ou une lysine, diminue *in vitro* l'activité enzymatique d'un facteur de 2, occasionnant une diminution notable de la quantité des chaînes de GAG synthétisées *in cellulo*. Les données structurales localisent cet acide aminé dans la boucle flexible qui va permettre le changement de conformation de l'enzyme (ouverte-fermée) permettant la fixation du xylose dans la poche catalytique suite à la fixation du manganèse et de l'UDP-Gal. Ces données expliquent en partie la réduction de la synthèse des GAGs associées aux pathologies des tissus conjonctifs observées chez les patients porteurs de la mutation à cette position et atteints de la forme

progéroïde du SED. Cette mutation au niveau de cette boucle pourrait déstabiliser l'ensemble de la boucle et conduire à des conformations enzymatiques inactives. Des études structurales plus poussées sont nécessaires pour établir ce point.

Nous avons donc identifié de nouveaux résidus importants à la fois dans l'organisation architecturale du site de fixation du substrat accepteur, mais également dans l'interaction de l'enzyme avec ce dernier. Si effectivement il a été précédemment montré que le résidu W224 est impliqué à la fois dans les interactions avec le substrat donneur et accepteur, et que l'aspartate en position 228 constituerait la base catalytique de la  $\beta$ 4GalT7 humaine (Talhaoui *et al.*, 2010), il est désormais nécessaire de considérer le caractère hydrophobe de l'entrée du site de fixation au substrat accepteur conféré par les tyrosine 194, 196 et 199 associés au résidu W224 dans la conception d'un effecteur xylosidique ciblant spécifiquement l'enzyme. En outre, nos données indiquent qu'il serait judicieux de tenir compte des résidus R226, R270, et H195 comme résidus « modulateurs » de l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 du fait de liaisons-hydrogènes « additionnelles » les impliquant avec certains groupements situés au niveau de l'aglycone.

En nous appuyant sur ces connaissances, nous avons initié la conception de molécules xylosidiques, inhibant potentiellement l'activité de la  $\beta$ 4GalT7. Trois molécules ont été testées : 4H-Xyl-NP, 4H-MOX, et 4F-MOX. Les résultats des expériences d'inhibition par compétition avec le 4-MOX montrent que, dans nos conditions expérimentales, le 4F-MOX, contrairement aux 4H-Xyl-NP et le 4H-MOX, réduit significativement l'activité de l'enzyme *in vitro* et inhibe la biosynthèse des chaînes de GAG de façon plus prononcée que les deux molécules précédentes *in cellulo*. En outre, les essais portant sur l'effet inhibiteur de ces trois molécules sur le niveau de glycosylation de la décorine montrent que le 4H-Xyl-NP n'affecte pas la glycosylation de ce substrat endogène, contrairement au 4H-MOX et 4F-MOX. Le 4F-MOX apparaît donc comme le meilleur candidat inhibiteur de l'enzyme.

Le pouvoir inhibiteur du 4F-MOX tient d'abord de la substitution du groupement hydroxyle par un atome de fluor en position 4 du xylose. Cette substitution empêche l'attaque acido-basique du groupement carboxylate de l'aspartate 228 qui initie la réaction catalytique de l'enzyme. Cette substitution permet par ailleurs de conserver dans la structure du xyloside un substituant en position 4 de masse comparable à celle d'un groupement hydroxyle et de charge partielle (négative) comparable à celui de l'oxygène permettant d'entretenir d'éventuelles liaisons hydrogène (ce qui ne sera pas le cas pour le 4H-Xyl-MO). En ce sens des travaux

antérieurs ont montré que des dérivés xylosidiques fluorés étaient de « bons » substrats/inhibiteurs de la  $\beta$ 4GalT7 (Lugemwa *et al.*, 1996 ; Esko *et al.*, 1987 ; Siegbahn *et al.*, 2014).

Il est également à noter que le choix de la MO comme aglycone contribue au potentiel inhibiteur du 4F-MOX. En effet, contrairement au groupement naphtyl-, le MO est capable d'établir des liaisons hydrogène avec le résidu H195 *via* son oxygène en position 1, ainsi qu'avec R226 *via* l'atome O3 du xylose du 4-MOX, tout en garantissant les interactions hydrophobes avec les résidus Y194, Y196, Y199, W224 situés à l'entrée de la poche de fixation. Tout ceci contribue vraisemblablement à la stabilisation du site de fixation du substrat accepteur et donc à l'affinité du composé pour l'enzyme. Ces résultats renforcent notre approche stratégique ainsi que les résultats obtenus par d'autres équipes (Tsuzuki *et al.*, 2010). Par ailleurs, ils expliquent, au moins en partie, la supériorité des inhibiteurs possédant une aglycone type MO sur celle des composés incluant un groupement naphtyl- par exemple.

Le 4F-MOX ayant été sélectionné comme un inhibiteur efficace vis-à-vis de la  $\beta$ 4GalT7, nous avons voulu évaluer sa capacité à inhiber la prolifération de cellules tumorales dans la mesure où les chaînes de GAG sont des éléments clés du caractère invasif durant les processus tumoraux (comme nous l'avons décrit dans la partie « Introduction » - Okolicsanyi *et al.*, 2014 ; Beauvais *et al.*, 2004). Le 4F-MOX (comme le 4-MOX) est non cytotoxique jusqu'à une concentration de 300  $\mu$ M dans le milieu de culture des cellules et est capable de réduire la prolifération cellulaire des deux lignées cellulaires cancéreuses humaines MDAMB-231 (tumeur mammaire) et SW1353 (chondrosarcome). Cette réduction de la prolifération cellulaire a pu être associée à la diminution de la synthèse des chaînes de GAGs *in cellulo* dans ces lignées.

Les inhibiteurs de la  $\beta$ 4GalT7 se positionnent donc comme des outils précieux dans les études structure-fonction des GTs pour l'exploration de la voie de biosynthèse des chaînes de GAG. Ils constituent de plus un point de départ pour le développement d'agents oligosacchridiques bioactifs, comme dans notre cas, des composés anti-tumoraux par exemple. Souvent, la conception et le développement des inhibiteurs de GTs ont été basés sur l'étude des analogues du substrat donneur « UDP-Gal » (Descroix *et al.*, 2011). En utilisant une recherche des inhibiteurs basée sur le substrat accepteur « xylose », nous augmentons potentiellement leur sélectivité, ce qui nous permet de cibler plus spécifiquement leur effet biologique, comme le caractère invasif des cellules tumorales dans le contexte de nos travaux et d'autres études

récentes (Siegbahn *et al.*, 2015). Comme dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses, les MDAMB-231 et SW1353 synthétisent des chaînes de GAG et des PGs qui sont directement impliqués dans les phénomènes de prolifération et de migration cellulaires. Les GAGs et les PGs peuvent en effet se lier à des facteurs de signalisation tels que les FGF (Venero-Galanternik *et al.*, 2015) mais aussi aux intégrines. Par exemple la décorine par son interaction avec les intégrines des cellules endothéliales et le collagène de type I de la matrice extracellulaire, promeut l'angiogenèse (Fiedler *et al.*, 2009). Le fait d'inhiber la synthèse des chaînes de GAG et par conséquent la glycosylation des PGs *in cellulo* peut donc être une approche prometteuse pour limiter la prolifération cellulaire dans un contexte tumoral.

# *Conclusions et perspectives*



Les PGs sont des molécules à localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituées d'une protéine porteuse appelée « protéine-core » sur laquelle sont greffées des chaînes linéaires polysidiques de GAGs. La diversité structurale des PGs permet la constitution de sites protéiques et/ou osidiques interagissant spécifiquement avec d'autres composants matriciels ou cellulaires, ainsi qu'avec des médiateurs solubles tels que les cytokines et les facteurs de croissance (Jackson *et al.*, 1991). Cette grande capacité interactive permet aux PGs et à leurs chaînes de GAG de participer à l'assemblage de la matrice tout en lui conférant de nombreuses propriétés rhéologiques dans les tissus conjonctifs (hydratation, résistance aux forces compressives, capacité de filtration, transparence) (Tatari *et al.*, 2007). Les PGs régulent également de nombreuses activités cellulaires impliqués dans de multiples processus physiopathologiques (prolifération, différenciation, adhérence, migration). Ces multiples fonctions biologiques peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques. Par exemple, l'activité anticoagulante de l'héparine est depuis longtemps connue et utilisée en prévention des thromboses. Plus récemment, la capacité des PGs à contrôler l'activité biologique des cytokines et des facteurs de croissance laisse entrevoir d'intéressantes applications (comme par exemple, la neutralisation des effets mitogènes des facteurs de croissance, ou encore la potentialisation d'activités régénératrices au niveau du tissu) dans le traitement de différentes pathologies. C'est dans ce contexte que notre équipe s'intéresse aux enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des GAGs, en particulier aux glycosyltransférases impliquées l'initiation de ce processus. Parmi ces enzymes, la  $\beta$ 4GalT7 qui catalyse le transfert du premier résidu galactose provenant d'un UDP-Gal sur le xylose fixé sur la protéine-core des PGs. Cette enzyme constitue une cible importante vers le développement de traitements de différentes pathologies, en raison de son implication dans les étapes précoces de synthèse des GAGs, mais surtout parce qu'elle possède la capacité unique d'initier les voies de biosynthèse des GAGs en utilisant des xylosides exogènes comme substrats. A ce titre, ce type de molécules attire un intérêt croissant dans le cadre du développement de traitements basés sur les propriétés biologiques des xylosides, comme par exemple des actions anti-cancéreuses, anti-thrombotiques ou encore régénératrices. Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe ont montré par exemple que la phosphorylation du xylose régule les voies de biosynthèse des GAGs dans la mesure où un xyloside phosphorylé sur l'hydroxyle en position 2 n'est pas substrat de la  $\beta$ 4GalT7 (Gulberti *et al.*, 2005). Pour réaliser le design de tels composés, nous avons effectué une étude structure-fonction poussée de l'enzyme de façon à

mettre en lumière l'architecture du site de fixation du substrat xylosidique afin de saisir les détails du mécanisme par lequel l'enzyme prend en charge ce dernier. Des études précédentes réalisées au sein de notre équipe ont montré que les résidus D165 et H257 forment des liaisons de coordination avec le cofacteur métallique de l'enzyme, le cation  $Mn^{2+}$  et proposé le rôle déterminant du résidu D228 dans la catalyse. Ils ont par ailleurs mis en évidence un rôle crucial du résidu aromatique W224 dans les interactions avec les substrats donneur et accepteur (Talhaoui *et al.*, 2010).

Au cours de ce travail de thèse, j'ai identifié d'autres acides aminés importants dans le mécanisme moléculaire de la prise en charge des substrats accepteurs par l'enzyme. J'ai ainsi :

- i) montré le rôle crucial des résidus aromatiques Y194, Y196, Y199 associé au W224 dans la reconnaissance, la fixation et le bon positionnement du substrat xylosidique dans la poche de fixation de l'enzyme,
- ii) suggéré le rôle de R226 dans la bonne orientation et/ou le bon positionnement du substrat xylosidique ;
- iii) confirmé le rôle structural probable du résidu R270 dans la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos ;
- iv) identifié le rôle du résidu H195 dans l'interaction potentielle de l'enzyme avec la partie aglycone du xyloside 4-MOX.

A l'aide de ces données, nous avons pu développer des xylosides modifiés dans le but de proposer des inhibiteurs xylosidiques ciblant spécifiquement la  $\beta 4GalT7$  et potentiellement bioactifs dans un contexte physiopathologique. Cette étape réalisée en collaboration avec l'ICOA à Orléans et le CERMAV de Grenoble, a favorisé le design de conjugués constitués d'un dérivé non chargé du xylose substitué en position 1 par un aglycone hydrophobe aromatique le 4-methylumbelliferyl- (4-MO) ou le groupement naphthyl- (NP). Le 4F-MOX semble être un inhibiteur efficace de la  $\beta 4GalT7$  humaine par rapport au 4-Xyl-NP ou au 4H-MOX, puisqu'il i) entre en compétition *in vitro* avec le substrat exogène 4-MOX avec un  $K_i$  de l'ordre de 0,03 mM, (comparable au  $K_m$ ) ii) est capable d'inhiber jusqu'à 45 % des chaînes de GAG néosynthétisées par les cellules CHO-pgsB618 (lorsqu'il est utilisé à 100  $\mu M$ ) et iii) bloque jusqu'à 60% de la glycanation de la décorine dans les cellules CHO-pgsB618 traitées par 500  $\mu M$  du composé. Enfin, son premier emploi sur des lignées cancéreuses humaines, telles que les cellules MDA MB-231 (issues d'une tumeur maligne mammaire) et les cellules SW1353 (issues d'un chondrosarcome), montrent que : i) le 4F-MOX n'est pas cytotoxique jusqu'à 400  $\mu M$ , ii) à 100  $\mu M$ , le 4F-MOX inhibe jusqu'à 30% de la biosynthèse des chaînes de GAG produites par ces cellules et iii) qu'à 300  $\mu M$ , il diminue de 30% la prolifération des cellules SW1353 et MDA MB-231 après 72 heures de traitement.

Ces expériences portant sur des substrats accepteurs modifiés, associées à une étude structurale avancée de la poche de fixation du xylose, nous ont permis de mieux comprendre la structure du site de fixation du substrat accepteur de l'enzyme et donc de proposer des xylosides (inhibiteurs) ciblant encore plus spécifiquement notre enzyme. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure et par quels mécanismes ces composés réduisent la prolifération cellulaire, puisque les GAGs sont connus pour être impliqués dans le caractère invasif de plusieurs processus tumoraux en interagissant avec différentes voies de signalisation impliquées dans la migration et la prolifération cellulaire telle que la voie des MAP-Kinases. En parallèle, il serait nécessaire d'optimiser la structure de ces molécules puis d'évaluer leurs effets sur d'autres paramètres cellulaires tels que la migration cellulaire, qui est un processus également associé à la prolifération dans un contexte tumoral. Enfin, il serait important d'établir le mécanisme moléculaire par lequel ces molécules modulent le comportement des cellules cancéreuses, et évaluer leurs effets dans un modèle murin de xénogreffes afin d'avoir une idée de l'impact de ces molécules xylosidiques *in vivo*.

Enfin, nos travaux ont également porté sur l'effet de la mutation affectant l'arginine en position 270 retrouvée dans la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers Danlos sur l'activité galactosyltransférase de la  $\beta$ 4GalT7. En effet la substitution de cet acide aminé par une alanine ou une lysine, diminue *in vitro* l'activité enzymatique d'un facteur de 2, occasionnant une diminution notable de la quantité des chaînes de GAG synthétisés *ex vivo* dans les cellules déficientes transfectées par ces mutants comparées à celles transfectées par l'enzyme sauvage. En comparant nos résultats à ceux présentés par Bui *et al.*, (2010), nous remarquons que l'activité enzymatique du mutant R270C est proche de celle de l'enzyme mutée R270A ou R270K. Ceci pourrait expliquer en partie la perturbation de synthèse des chaînes de GAG au niveau du cartilage en particulier mais aussi des autres tissus conjonctifs, chez les patients touchés par cette forme de SED. Afin de compléter ces travaux, il serait intéressant d'étudier la nature, la longueur et la « qualité » des chaînes de GAG synthétisées par des cellules déficientes en  $\beta$ 4GalT7 et transfectées par des vecteurs comportant le gène codant l'enzyme mutée R270C, R270A ou R270K. Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier l'impact de ces mutations sur des paramètres physico-chimiques tels que le niveau de sulfatation, la composition disaccharidique ainsi que la longueur des chaînes de GAG néosynthétisées par des cellules exprimant l'enzyme mutée à cette position. La comparaison des données obtenues pour les mutants avec celles obtenues pour la  $\beta$ 4GalT7 sauvage dans les mêmes conditions,

nous permettrait de mieux discuter de l'impact de la mutation de l'arginine 270 sur la longueur, la composition et la qualité globale des chaînes de GAG dans le contexte du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos. L'ensemble de ces données pourraient à terme permettre d'expliquer le rôle de la  $\beta$ 4GalT7 dans la physiopathologie de la forme progéroïde du SED et de proposer des xylosides bioactifs capables de s'opposer à la perte de synthèse des GAGs observés dans ce contexte pathologique

*Références*  
*Bibliographiques*

- Abid, M.R., Yi, X., Yano, K., Shih, S.-C., and Aird, W.C. (2006). Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc. Res.* 72, 136–145.
- Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C.P.C., Buchini, S., Lairson, L.L., Chen, H., Strynadka, N.C.J., Wakarchuk, W.W., and Withers, S.G. (2006). High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat. Methods* 3, 609–614.
- Ahn, J., Lüdecke, H.J., Lindow, S., Horton, W.A., Lee, B., Wagner, M.J., Horsthemke, B., and Wells, D.E. (1995). Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat. Genet.* 11, 137–143.
- Aikawa, J. (2001). [Functional roles of GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferases in the biosynthesis of heparan sulfate/heparin]. *Seikagaku* 73, 479–483.
- Aikawa, J., and Esko, J.D. (1999). Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. *J. Biol. Chem.* 274, 2690–2695.
- Almeida, R., Levery, S.B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E.P., and Clausen, H. (1999). Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose:β-Xylose β1,4-Galactosyltransferase I A SEVENTH MEMBER OF THE HUMAN β4-GALACTOSYLTRANSFERASE GENE FAMILY. *J. Biol. Chem.* 274, 26165–26171.
- Aspberg, A. (2012). The different roles of aggrecan interaction domains. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 987–996.
- Baciu, P.C., Saoncella, S., Lee, S.H., Denhez, F., Leuthardt, D., and Goetinck, P.F. (2000). Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 315–324.
- Bai, X., and Esko, J.D. (1996). An animal cell mutant defective in heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfation. *J. Biol. Chem.* 271, 17711–17717.
- Bai, X., Bame, K.J., Habuchi, H., Kimata, K., and Esko, J.D. (1997). Turnover of heparan sulfate depends on 2-O-sulfation of uronic acids. *J. Biol. Chem.* 272, 23172–23179.
- Bai, X., Zhou, D., Brown, J.R., Crawford, B.E., Hennet, T., and Esko, J.D. (2001). Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). *J. Biol. Chem.* 276, 48189–48195.
- Balta, S., Mikhailidis, D.P., Demirkol, S., Ozturk, C., Celik, T., and Iyisoy, A. (2015). Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis* 243, 339–343.

- Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D.H., Theocharis, A.D., and Karamanos, N. (2014). Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Mol. Cell. Oncol.* *4*, 4.
- Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Koevoet, W., Feijt, C., Bos, P.K., Verhaar, J. a. N., Van Osch, G.J.V.M., and DeGroot, J. (2009). Proteoglycan production is required in initial stages of new cartilage matrix formation but inhibits integrative cartilage repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *3*, 117–123.
- Bates, S.E., Valverius, E.M., Ennis, B.W., Bronzert, D.A., Sheridan, J.P., Stampfer, M.R., Mendelsohn, J., Lippman, M.E., and Dickson, R.B. (1990). Expression of the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor pathway in normal human breast epithelial cells. *Endocrinology* *126*, 596–607.
- Beauvais, D.M., Burbach, B.J., and Rapraeger, A.C. (2004). The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *167*, 171–181.
- Beck, M., Glössl, J., Rüter, R., and Kresse, H. (1983). Abnormal proteodermatan sulfate in three patients with Coffin-Lowry syndrome. *Pediatr. Res.* *17*, 926–929.
- Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P., and Wenstrup, R.J. (1998). Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am. J. Med. Genet.* *77*, 31–37.
- Bi, X.-L., and Yang, W. (2013). Biological functions of decorin in cancer. *Chin. J. Cancer* *32*, 266–269.
- Biglari, A., Bataille, D., Naumann, U., Weller, M., Zirger, J., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2004). Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model. *Cancer Gene Ther.* *11*, 721–732.
- Blackhall, F.H., Merry, C.L., Davies, E.J., and Jayson, G.C. (2001). Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br. J. Cancer* *85*, 1094–1098.
- Brandan, E., and Hirschberg, C.B. (1988). Purification of rat liver N-heparan-sulfate sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *263*, 2417–2422.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S., and Palcic, M.M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *22*, 540–549.
- Brett, M.J., and Robinson, H.C. (1971). The effect of xylose on chondroitin sulphate biosynthesis in embryonic cartilage. In *Proc. Aust. Biochem. Soc.*, p. 92.
- Bruinsma, I.B., te Riet, L., Gevers, T., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., David, G., Küsters, B., de Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2010). Sulfation of heparan sulfate associated with

amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 211–220.

Bui, C., Talhaoui, I., Chabel, M., Mulliert, G., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2010). Molecular characterization of  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 genetic mutations linked to the progeroid form of Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *FEBS Lett.* 584, 3962–3968.

Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S., and Wilson, V.A. (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev.* 12, 1894–1906.

Burch, G.H., Gong, Y., Liu, W., Dettman, R.W., Curry, C.J., Smith, L., Miller, W.L., and Bristow, J. (1997). Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat. Genet.* 17, 104–108.

Cabral, A., and Castor, C.W. (1983). Connective tissue activation. XXVII. The behavior of skin fibroblasts from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 26, 1362–1369.

Cadwalader, E.L., Condic, M.L., and Yost, H.J. (2012). 2-O-sulfotransferase regulates Wnt signaling, cell adhesion and cell cycle during zebrafish epiboly. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1296–1305.

Campbell, null, Davies, null, Bulone, null, and Henrissat, null (1998). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 719.

Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326 (Pt 3), 929–939.

Campbell, P., Hannesson, H.H., Sandbäck, D., Rodén, L., Lindahl, U., and Li, J.P. (1994). Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Purification of the D-glucuronyl C-5 epimerase from bovine liver. *J. Biol. Chem.* 269, 26953–26958.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238.

Carey, D.J. (1996). N-syndecan: structure and function of a transmembrane heparan sulfate proteoglycan. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 331–346.

Carmichael, D.J., Gillard, G.C., Lowther, D.A., Handley, C.J., and Santer, V.B. (1977). Carrageenin-induced arthritis. IV. Rate changes in cartilage matrix proteoglycan synthesis. *Arthritis Rheum.* 20, 834–840.



- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J.H., Jepsen, K.J., LaMantia, C., and Carroll, H. (1998). Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* *141*, 1277–1286.
- Chandrasekhar, S., and Harvey, A.K. (1987). Synthesis of type IX collagen: Effect of  $\beta$ -xylosides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *146*, 1040–1046.
- Chaudhary, K., Moore, H., Tandon, A., Gupta, S., Khanna, R., and Mohan, R.R. (2014). Nanotechnology and adeno-associated virus-based decorin gene therapy ameliorates peritoneal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *307*, F777–F782.
- Chen, J., and Liu, J. (2005). Characterization of the structure of antithrombin-binding heparan sulfate generated by heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5. *Biochim. Biophys. Acta* *1725*, 190–200.
- Chen, J., Duncan, M.B., Carrick, K., Pope, R.M., and Liu, J. (2003). Biosynthesis of 3-O-sulfated heparan sulfate: unique substrate specificity of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5. *Glycobiology* *13*, 785–794.
- Chen, N., Chen, C.C., and Lau, L.F. (2000). Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *275*, 24953–24961.
- Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* *22*, 3099–3108.
- Chistiakov, D.A. (2010). Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation. *J. Biomed. Sci.* *17*, 92.
- Chopra, A. (2004). Humanized anti-CD44v6 monoclonal antibody labeled with IRDye800CW. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)),.
- Compain, P., and Martin, O.R. (2001). Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* *9*, 3077–3092.
- Cook, A., Raskind, W., Blanton, S.H., Pauli, R.M., Gregg, R.G., Francomano, C.A., Puffenberger, E., Conrad, E.U., Schmale, G., and Schellenberg, G. (1993). Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet.* *53*, 71–79.
- Cöster, L., Hernnäs, J., and Malmström, A. (1991). Biosynthesis of dermatan sulphate proteoglycans. The effect of beta-D-xyloside addition on the polymer-modification process in fibroblast cultures. *Biochem. J.* *276 (Pt 2)*, 533–539.
- Couchman, J.R., Gopal, S., Lim, H.C., Nørgaard, S., and Mulhaupt, H.A.B. (2015).

Syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *Int. J. Exp. Pathol.* *96*, 1–10.

Coulson-Thomas, Y.M., Coulson-Thomas, V.J., Norton, A.L., Gesteira, T.F., Cavalheiro, R.P., Meneghetti, M.C.Z., Martins, J.R., Dixon, R.A., and Nader, H.B. (2015). The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. *PloS One* *10*, e0131105.

Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* *328*, 307–317.

Cox, L.A.E., van Eijk, L.T., Ramakers, B.P.C., Dorresteyn, M.J., Gerretsen, J., Kox, M., and Pickkers, P. (2015). Inflammation-induced increases in plasma endocan levels are associated with endothelial dysfunction in humans in vivo. *Shock Augusta Ga* *43*, 322–326.

Crawford, B.E., Olson, S.K., Esko, J.D., and Pinhal, M.A. (2001). Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *276*, 21538–21543.

Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G.A., and Small, D.H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* *65*, 108–120.

Day, J.M., Olin, A.I., Murdoch, A.D., Canfield, A., Sasaki, T., Timpl, R., Hardingham, T.E., and Aspberg, A. (2004). Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* *279*, 12511–12518.

de Agostini, A.I., Dong, J.-C., de Vantéry Arrighi, C., Ramus, M.-A., Dentand-Quadri, I., Thalmann, S., Ventura, P., Ibecheole, V., Monge, F., Fischer, A.-M., et al. (2008). Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity. *J. Biol. Chem.* *283*, 28115–28124.

De Paepe, A., Nuytinck, L., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., and Naeyaert, J.M. (1997). Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 547–554.

De Rossi, G., Evans, A.R., Kay, E., Woodfin, A., McKay, T.R., Nourshargh, S., and Whiteford, J.R. (2014). Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis. *J. Cell Sci.* *127*, 4788–4799.

Descroix, K., and Wagner, G.K. (2011). The first C-glycosidic analogue of a novel galactosyltransferase inhibitor. *Org. Biomol. Chem.* *9*, 1855–1863.

Dews, I.C., and Mackenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 20782–20787.

Dondi, P., and Muir, H. (1976). Collagen synthesis and deposition in cartilage during disrupted proteoglycan production. *Biochem. J.* *160*, 117.

Dou, W., Xu, Y., Pagadala, V., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2015). Role of Deacetylase Activity of N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 in Forming N-Sulfated Domain in Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* *290*, 20427–20437.

Dwivedi, P.P., Lam, N., and Powell, B.C. (2013). Boning up on glypicans--opportunities for new insights into bone biology. *Cell Biochem. Funct.* *31*, 91–114.

Elfenbein, A., and Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* *126*, 3799–3804.

Eriksson, I., Sandbäck, D., Ek, B., Lindahl, U., and Kjellén, L. (1994). cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. *J. Biol. Chem.* *269*, 10438–10443.

Esko, J.D., and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 663–670.

Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.

Esko, J.D., Weinke, J.L., Taylor, W.H., Ekborg, G., Rodén, L., Anantharamaiah, G., and Gawish, A. (1987). Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* *262*, 12189–12195.

Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A., and Carson, D.D. (2014). Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *34*, 64–79.

Ferreras, C., Rushton, G., Cole, C.L., Babur, M., Telfer, B.A., van Kuppevelt, T.H., Gardiner, J.M., Williams, K.J., Jayson, G.C., and Avizienyte, E. (2012). Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *287*, 36132–36146.

Fiedler, L.R., and Eble, J.A. (2009). Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis. *Cell Adhes. Migr.* *3*, 3–6.

Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., and Vlodavsky, I. (1988). A

heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* *130*, 393–400.

Forsberg, E., and Kjellén, L. (2001). Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J. Clin. Invest.* *108*, 175–180.

Fransson, L.A., Havsmark, B., Sakurai, K., and Suzuki, S. (1992). Sequence analysis of p-hydroxyphenyl-O-beta-D-xyloside initiated and radio-iodinated dermatan sulfate from skin fibroblasts. *Glycoconj. J.* *9*, 45–55.

Fransson, L.-A., Silverberg, I., and Carlstedt, I. (1985). Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. *J. Biol. Chem.* *260*, 14722–14726.

Freeze, H.H., and Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 490–498.

Fritz, T.A., Lagemwa, F.N., Sarkar, A.K., and Esko, J.D. (1994). Biosynthesis of heparan sulfate on beta-D-xylosides depends on aglycone structure. *J. Biol. Chem.* *269*, 300–307.

Fukunaga, Y., Sobue, M., Suzuki, N., Kushida, H., Suzuki, S., and Suzuki, S. (1975). Synthesis of a fluorogenic mucopolysaccharide by chondrocytes in cell culture with 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-xyloside. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *381*, 443–447.

Fukuta, M., Kobayashi, Y., Uchimura, K., Kimata, K., and Habuchi, O. (1998). Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* *1399*, 57–61.

Galligani, L., Hopwood, J., Schwartz, N.B., and Dorfman, A. (1975). Stimulation of synthesis of free chondroitin sulfate chains by beta-D-xylosides in cultured cells. *J. Biol. Chem.* *250*, 5400–5406.

Garud, D.R., Tran, V.M., Victor, X.V., Koketsu, M., and Kuberan, B. (2008). Inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 28881–28887.

Germain, D.P. (2007). Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 32.

Gibson, K.D., and Segen, B.J. (1977). The mode of action of 4-methylumbelliferyl beta-D-xyloside on the synthesis of chondroitin sulphate in embryonic-chicken sternum. *Biochem. J.* *168*, 65–79.

Gibson, K.D., Segen, B.J., and Audhya, T.K. (1977). The effect of beta-D-xylosides on chondroitin sulphate biosynthesis in embryonic chicken cartilage in the absence of protein

synthesis inhibitors. *Biochem J* 162, 217–233.

Glössl, J., Beck, M., and Kresse, H. (1984). Biosynthesis of proteodermatan sulfate in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259, 14144–14150.

Gotoh, M., Sato, T., Akashima, T., Iwasaki, H., Kameyama, A., Mochizuki, H., Yada, T., Inaba, N., Zhang, Y., Kikuchi, N., et al. (2002). Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 38189–38196.

Götte, M., and Kresse, H. (2005). Defective glycosaminoglycan substitution of decorin in a patient with progeroid syndrome is a direct consequence of two point mutations in the galactosyltransferase I (beta4GalT-7) gene. *Biochem. Genet.* 43, 65–77.

Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2000). Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J. Mol. Biol.* 304, 517–528.

Grigoriu, B.D., Depontieu, F., Scherpereel, A., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., Lafitte, J.-J., Copin, M.-C., Tonnel, A.-B., and Lassalle, P. (2006). Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 4575–4582.

Gulberti, S., Jacquinet, J.-C., Chabel, M., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., Netter, P., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2012). Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) involved in chondroitin sulfate initiation: Impact of sulfation on activity and specificity. *Glycobiology* 22, 561–571.

Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 280, 1417–1425.

Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 280, 1417–1425.

Guo, M.H., Stoler, J., Lui, J., Nilsson, O., Bianchi, D.W., Hirschhorn, J.N., and Dauber, A. (2013). Redefining the Progeroid Form of Ehlers-Danlos Syndrome: Report of the Fourth

Patient with B4GALT7 Deficiency and Review of the Literature. *Am. J. Med. Genet. A.* *161*, 2519–2527.

Habuchi, H., and Kimata, K. (2010). Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *93*, 79–111.

Habuchi, H., Habuchi, O., and Kimata, K. (1995). Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 4172–4179.

Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R.L., and Kimata, K. (2007). Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *J. Biol. Chem.* *282*, 15578–15588.

Habuchi, O. (2000). [Biological function of chondroitin sulfate and sulfotransferases]. *Seikagaku* *72*, 427–436.

Habuchi, O., and Habuchi, H. (1998). [Sulfotransferases involved in the biosynthesis of glycosaminoglycans]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* *43*, 2378–2386.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 385–410.

Hardingham, T.E., and Fosang, A.J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *6*, 861–870.

Harper, G.S., Hascall, V.C., Yanagishita, M., and Gahl, W.A. (1987). Proteoglycan synthesis in normal and Lowe syndrome fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *262*, 5637–5643.

Hashimoto, K., Madej, T., Bryant, S.H., and Panchenko, A.R. (2010). Functional states of homooligomers: insights from the evolution of glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* *399*, 196–206.

Hashimoto, K., Tokimatsu, T., Kawano, S., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Goto, S., and Kanehisa, M. (2009). Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans. *Carbohydr. Res.* *344*, 881–887.

Hashimoto, Y., Orellana, A., Gil, G., and Hirschberg, C.B. (1992). Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *267*, 15744–15750.

Helting, T., and Rodén, L. (1969). Biosynthesis of chondroitin sulfate. II. Glucuronosyl transfer in the formation of the carbohydrate-protein linkage region. *J. Biol. Chem.* *244*, 2799–2805.

- Hennet, T. (2002). The galactosyltransferase family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 1081–1095.
- Hernández, A., Aguirre-Negrete, M.G., González-Flores, S., Reynoso-Luna, M.C., Fragoso, R., Nazar, Z., Tapia-Arizmendi, G., and Cantú, J.M. (1986). Ehlers-Danlos features with progeroid facies and mild mental retardation. Further delineation of the syndrome. *Clin. Genet.* 30, 456–461.
- Hernández, A., Aguirre-Negrete, M.G., Liparoli, J.C., and Cantú, J.M. (1981). Third case of a distinct variant of the Ehlers-Danlos Syndrome (EDS). *Clin. Genet.* 20, 222–224.
- Hernández, A., Aguirre-Negrete, M.G., Ramírez-Soltero, S., González-Mendoza, A., Martínez y Martínez, R., Velázquez-Cabrera, A., and Cantú, J.M. (1979). A distinct variant of the Ehlers-Danlos syndrome. *Clin. Genet.* 16, 335–339.
- Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Van Kuppevelt, T.H., and Nishihara, S. (2012). 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contributes [corrected] to the differentiation of mouse embryonic stem cells via fas signaling. *PLoS One* 7, e43440.
- Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N., and Fukuda, M. (2000). Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 275, 20188–20196.
- Hopwood, J.J., and Dorfman, A. (1977). Glycosaminoglycan synthesis by cultured human skin fibroblasts after transformation with simian virus 40. *J. Biol. Chem.* 252, 4777–4785.
- Horváth, Z., Kovalszky, I., Fullár, A., Kiss, K., Schaff, Z., Iozzo, R.V., and Baghy, K. (2014). Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 35, 194–205.
- Hu, Y., and Walker, S. (2002). Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem. Biol.* 9, 1287–1296.
- Incardona, F., Lawler, J., Cataldo, D., Panet, A., Legrand, Y., Foidart, J.M., and Legrand, C. (1996). Heparin-binding domain, type 1 and type 2 repeats of thrombospondin mediate its interaction with human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 62, 431–442.
- Inki, P., and Jalkanen, M. (1996). The role of syndecan-1 in malignancies. *Ann. Med.* 28, 63–67.
- Iozzo, R.V. (1997). The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 141–174.
- Iozzo, R.V., Zoeller, J.J., and Nyström, A. (2009). Basement membrane proteoglycans: modulators of cancer growth and angiogenesis. *Mol. Cells* 27, 503–513.

Irie, A., Habuchi, H., Kimata, K., and Sanai, Y. (2003). Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 858–865.

Ishihara, M., and Mamiya, G. (1989). [Role of heparan sulfate proteoglycan for control of cell growth]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* *34*, 853–862.

Izumikawa, T., Koike, T., Shiozawa, S., Sugahara, K., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2008). Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *J. Biol. Chem.* *283*, 11396–11406.

Izumikawa, T., Okuura, Y., Koike, T., Sakoda, N., and Kitagawa, H. (2011). Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Biochem. J.* *434*, 321–331.

Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D. (1991). Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* *71*, 481–539.

Jacobsson, M., Ellervik, U., Belting, M., and Mani, K. (2006). Selective antiproliferative activity of hydroxynaphthyl-beta-D-xylosides. *J. Med. Chem.* *49*, 1932–1938.

Jerosch, J., and rg (2011). Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int. J. Rheumatol.* *2011*, e969012.

Johnsson, R., Mani, K., and Ellervik, U. (2007). Synthesis and biology of bis-xylosylated dihydroxynaphthalenes. *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 2868–2877.

Kali, A., and Shetty, K.S.R. (2014). Endocan: A novel circulating proteoglycan. *Indian J. Pharmacol.* *46*, 579.

Kalita, M., Quintero, M.V., Raman, K., Tran, V.M., and Kuberan, B. (2015). Synthesis and biomedical applications of xylosides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1229*, 517–528.

Kapitonov, D., and Yu, R.K. (1999). Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* *9*, 961–978.

Kapitonov, D., and Yu, R.K. (1999). Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* *9*, 961–978.

Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., and Yang, B.B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* *12*, 19–32.

Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., and Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in



- heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7176–7181.
- Kinnunen, T., Huang, Z., Townsend, J., Gatdula, M.M., Brown, J.R., Esko, J.D., and Turnbull, J.E. (2005). Heparan 2-O-sulfotransferase, *hst-2*, is essential for normal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1507–1512.
- Kirsch, T., Koyama, E., Liu, M., Golub, E.E., and Pacifici, M. (2002). Syndecan-3 is a selective regulator of chondrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* *277*, 42171–42177.
- Kitagawa, H., Fujita, M., Ito, N., and Sugahara, K. (2000). Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *275*, 21075–21080.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *274*, 13933–13937.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K.W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T., and Sugahara, K. (1998). Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *273*, 6615–6618.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K. (2008). Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* *283*, 27438–27443.
- Kjellén, L. (2003). Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 340–342.
- Klagsbrun, M. (1992). Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions. *Semin. Cancer Biol.* *3*, 81–87.
- Knudson, C.B., and Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* *12*, 69–78.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996). Purification and characterization of heparan sulfate 2-sulfotransferase from cultured Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 7645–7653.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O., and Kimata, K. (1997). Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *272*, 13980–13985.

- Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N.W., Silbert, J.E., and Rosenberg, R.D. (1999a). Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* *274*, 10474–10480.
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. (2000). Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 860–867.
- Kobayashi, T., Honke, K., Tsunematsu, I., Kagaya, H., Nishikawa, S., Hokari, K., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., Higuchi, A., et al. (1999b). Detection of cerebroside sulfotransferase mRNA in human gastric mucosa and adenocarcinoma. *Cancer Lett.* *138*, 45–51.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J.-I., and Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem. J.* *421*, 157–162.
- Kolset, S.O., and Tveit, H. (2008). Serglycin--structure and biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 1073–1085.
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K., and Theocharis, A.D. (2014). Serglycin: At the Crossroad of Inflammation and Malignancy. *Front. Oncol.* *3*.
- Kresse, H., Rosthøj, S., Quentin, E., Hollmann, J., Glössl, J., Okada, S., and Tønnesen, T. (1987). Glycosaminoglycan-free small proteoglycan core protein is secreted by fibroblasts from a patient with a syndrome resembling progeroid. *Am. J. Hum. Genet.* *41*, 436–453.
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J., and Lindahl, U. (2006). Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J. Cell Biol.* *174*, 323–327.
- Kuberan, B., Ethirajan, M., Victor, X.V., Tran, V., Nguyen, K., and Do, A. (2008). “Click” xylosides initiate glycosaminoglycan biosynthesis in a mammalian cell line. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *9*, 198–200.
- Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Pikas, D.S., and Kjellén, L. (1998). Identification and expression in mouse of two heparan sulfate glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase genes. *J. Biol. Chem.* *273*, 11902–11907.
- Labropoulou, V.T., Skandalis, S.S., Ravazoula, P., Perimenis, P., Karamanos, N.K., Kalofonos, H.P., and Theocharis, A.D. (2013). Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours. *BioMed Res. Int.* *2013*, 214864.
- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., McNeely, M., Liu, J., Lamperti, E.D.,

- Toselli, P.A., Lech, M., Spear, P.G., et al. (2007). The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 26, 442–455.
- Le Merrer, M., Legeai-Mallet, L., Jeannin, P.M., Horsthemke, B., Schinzel, A., Plauchu, H., Toutain, A., Achard, F., Munnich, A., and Maroteaux, P. (1994). A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p. *Hum. Mol. Genet.* 3, 717–722.
- Ledin, J., Ringvall, M., Thuveson, M., Eriksson, I., Wilén, M., Kusche-Gullberg, M., Forsberg, E., and Kjellén, L. (2006). Enzymatically active N-deacetylase/N-sulfotransferase-2 is present in liver but does not contribute to heparan sulfate N-sulfation. *J. Biol. Chem.* 281, 35727–35734.
- Lee, W., Ku, S.-K., Kim, S.-W., and Bae, J.-S. (2014). Endocan elicits severe vascular inflammatory responses in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 229, 620–630.
- Leroy, X., Aubert, S., Zini, L., Franquet, H., Kervoaze, G., Villers, A., Delehedde, M., Copin, M.-C., and Lassalle, P. (2010). Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology* 56, 180–187.
- Levitt, D., and Doreman, A. (1973). Control of chondrogenesis in limb-bud cell cultures by bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2201–2205.
- Levitt, D., and Dorfman, A. (1972). The irreversible inhibition of differentiation of limb-bud mesenchyme by bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 1253–1257.
- Li, J.P., Gong, F., El Darwish, K., Jalkanen, M., and Lindahl, U. (2001). Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 276, 20069–20077.
- Li, J. (2010). Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 59–78.
- Li, K., Bethea, H.N., and Liu, J. (2010). Using engineered 2-O-sulfotransferase to determine the activity of heparan sulfate C5-epimerase and its mutants. *J. Biol. Chem.* 285, 11106–11113.
- Li, X.-J., Ong, C.K., Cao, Y., Xiang, Y.-Q., Shao, J.-Y., Ooi, A., Peng, L.-X., Lu, W.-H., Zhang, Z., Petillo, D., et al. (2011). Serglycin is a theranostic target in nasopharyngeal carcinoma that promotes metastasis. *Cancer Res.* 71, 3162–3172.
- Lim, H.C., and Couchman, J.R. (2014). Syndecan-2 regulation of morphology in breast carcinoma cells is dependent on RhoGTPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2482–2490.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., and Lidholt, K. (1998). The putative tumor

suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *273*, 26265–26268.

Lindahl, U., and Roden, L. (1965). THE ROLE OF GALACTOSE AND XYLOSE IN THE LINKAGE OF HEPARIN TO PROTEIN. *J. Biol. Chem.* *240*, 2821–2826.

Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L., and Leder, I.G. (1980). Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 6551–6555.

Lindahl, U., Kusche, M., Lidholt, K., and Oscarsson, L.G. (1989). Biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *556*, 36–50.

Liu, J., and Pedersen, L.C. (2007). Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *74*, 263–272.

Liu, J., Shworak, N.W., Sinay, P., Schwartz, J.J., Zhang, L., Fritze, L.M., and Rosenberg, R.D. (1999). Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J. Biol. Chem.* *274*, 5185–5192.

Lugemwa, F.N., and Esko, J.D. (1991). Estradiol beta-D-xyloside, an efficient primer for heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *266*, 6674–6677.

Lugemwa, F.N., Sarkar, A.K., and Esko, J.D. (1996). Unusual beta-D-xylosides that prime glycosaminoglycans in animal cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 19159–19165.

Luzhetskyy, A., Vente, A., and Bechthold, A. (2005). Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of biologically active natural products that contain oligosaccharides. *Mol. Biosyst.* *1*, 117–126.

Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J.-P., and Malmström, A. (2006). Biosynthesis of dermatan sulfate: chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J. Biol. Chem.* *281*, 11560–11568.

Malfait, F., De Coster, P., Hausser, I., van Essen, A.J., Franck, P., Colige, A., Nusgens, B., Martens, L., and De Paepe, A. (2004). The natural history, including orofacial features of three patients with Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type (EDS type VIIC). *Am. J. Med. Genet. A.* *131*, 18–28.

Malfait, F., Symoens, S., De Backer, J., Hermanns-Lê, T., Sakalihasan, N., Lapière, C.M., Coucke, P., and De Paepe, A. (2007). Three arginine to cysteine substitutions in the pro- $\alpha$  (I)-collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood. *Hum. Mutat.* *28*, 387–395.

Mali, M., Andtfolk, H., Miettinen, H.M., and Jalkanen, M. (1994). Suppression of tumor cell

growth by syndecan-1 ectodomain. *J. Biol. Chem.* 269, 27795–27798.

Malik, V., and Black, G.W. (2012). Structural, functional, and mutagenesis studies of UDP-glycosyltransferases. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 87, 87–115

Mani, K., Belting, M., Ellervik, U., Falk, N., Svensson, G., Sandgren, S., Cheng, F., and Fransson, L.-A. (2004). Tumor attenuation by 2(6-hydroxynaphthyl)-beta-D-xylopyranoside requires priming of heparan sulfate and nuclear targeting of the products. *Glycobiology* 14, 387–397.

Mani, K., Havsmark, B., Persson, S., Kaneda, Y., Yamamoto, H., Sakurai, K., Ashikari, S., Habuchi, H., Suzuki, S., Kimata, K., et al. (1998). Heparan/chondroitin/dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-O-beta-D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells. *Cancer Res.* 58, 1099–1104.

Mansouri, R., Haÿ, E., Marie, P.J., and Modrowski, D. (2015). Role of syndecan-2 in osteoblast biology and pathology. *BoneKEy Rep.* 4, 666.

Masibay, A.S., Balaji, P.V., Boeggeman, E.E., and Qasba, P.K. (1993). Mutational analysis of the Golgi retention signal of bovine beta-1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268, 9908–9916.

Matsushima, N., Ohyanagi, T., Tanaka, T., and Kretsinger, R.H. (2000). Super-motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans--biglycan, decorin, lumican, fibromodulin, PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphycan, and osteoglycin. *Proteins* 38, 210–225.

McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., and Tufaro, F. (2000). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 668–673.

McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L.E., Dyer, A.P., and Tufaro, F. (1998). The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat. Genet.* 19, 158–161.

McKeehan, W.L., Wu, X., and Kan, M. (1999). Requirement for anticoagulant heparan sulfate in the fibroblast growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* 274, 21511–21514.

Merry, C.L., Bullock, S.L., Swan, D.C., Backen, A.C., Lyon, M., Beddington, R.S., Wilson, V.A., and Gallagher, J.T. (2001). The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st<sup>-/-</sup> mutant mouse. *J. Biol. Chem.* 276, 35429–35434.

Midura, R.J., Calabro, A., Yanagishita, M., and Hascall, V.C. (1995). Nonreducing end structures of chondroitin sulfate chains on aggrecan isolated from Swarm rat chondrosarcoma

cultures. *J. Biol. Chem.* 270, 8009–8015.

Mikami, T., Mizumoto, S., Kago, N., Kitagawa, H., and Sugahara, K. (2003). Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 36115–36127.

Mislick, K.A., and Baldeschwieler, J.D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12349–12354.

Mitchell, D., and Hardingham, T. (1982). The control of chondroitin sulphate biosynthesis and its influence on the structure of cartilage proteoglycans. *Biochem J* 202, 387–395.

Miyake, N., Kosho, T., and Matsumoto, N. (2014). Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. *Adv. Exp. Med. Biol.* 802, 145–159.

Mochizuki, H., Yoshida, K., Gotoh, M., Sugioka, S., Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Tawada, A., Maeyama, K., Inaba, N., Hiruma, T., et al. (2003). Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *J. Biol. Chem.* 278, 26780–26787.

Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008). Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 283, 31237–31245.

Mohan, R.R., Tovey, J.C.K., Gupta, R., Sharma, A., and Tandon, A. (2011). Decorin biology, expression, function and therapy in the cornea. *Curr. Mol. Med.* 11, 110–128.

Moses, J., Oldberg, A., and Fransson, L.A. (1999). Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside. *Eur. J. Biochem. FEBS* 260, 879–884.

Moses, J., Oldberg, A., Cheng, F., and Fransson, L.A. (1997). Biosynthesis of the proteoglycan decorin--transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region. *Eur. J. Biochem. FEBS* 248, 521–526.

Mundt, F., Heidari-Hamedani, G., Nilsonne, G., Metintas, M., Hjerpe, A., and Dobra, K. (2014). Diagnostic and prognostic value of soluble syndecan-1 in pleural malignancies. *BioMed Res. Int.* 2014, 419853.

Mythreye, K., and Blobel, G.C. (2009). Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell. Signal.* 21, 1548–1558.

Nadanaka, S., Fujita, M., and Sugahara, K. (1999). Demonstration of a novel sulfotransferase

in fetal bovine serum, which transfers sulfate to the C6 position of the GalNAc residue in the sequence iduronic acid alpha1-3GalNAc beta1-4iduronic acid in dermatan sulfate. *FEBS Lett.* *452*, 185–189.

Nakamura, Y., Haines, N., Chen, J., Okajima, T., Furukawa, K., Urano, T., Stanley, P., Irvine, K.D., and Furukawa, K. (2002). Identification of a *Drosophila* gene encoding xylosylprotein beta4-galactosyltransferase that is essential for the synthesis of glycosaminoglycans and for morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *277*, 46280–46288.

Nastase, M.V., Young, M.F., and Schaefer, L. (2012). Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 963–975.

Neill, T., Schaefer, L., and Iozzo, R.V. (2012). Decorin. *Am. J. Pathol.* *181*, 380–387.

Neugebauer, J.M., Cadwallader, A.B., Amack, J.D., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2013). Differential roles for 3-OSTs in the regulation of cilia length and motility. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3892–3902.

Nguyen, T.K.N., Tran, V.M., Sorna, V., Eriksson, I., Kojima, A., Koketsu, M., Loganathan, D., Kjellén, L., Dorsky, R.I., Chien, C.-B., et al. (2013). Dimerized glycosaminoglycan chains increase FGF signaling during zebrafish development. *ACS Chem. Biol.* *8*, 939–948.

Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2008). Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* *60*, 818–823.

Nikitovic, D., Kouvidi, K., Voudouri, K., Berdiaki, A., Karousou, E., Passi, A., and Tzanakakis, G.N. (2014). The motile breast cancer phenotype roles of proteoglycans/glycosaminoglycans. *BioMed Res. Int.* *2014*, 124321.

Nilsson, U., Jacobsson, M., Johnsson, R., Mani, K., and Ellervik, U. (2009). Antiproliferative effects of peracetylated naphthoxylosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *19*, 1763–1766.

Nilsson, U., Johnsson, R., Fransson, L.-A., Ellervik, U., and Mani, K. (2010). Attenuation of tumor growth by formation of antiproliferative glycosaminoglycans correlates with low acetylation of histone H3. *Cancer Res.* *70*, 3771–3779.

Nuytinck, L., Freund, M., Lagae, L., Pierard, G.E., Hermanns-Le, T., and De Paepe, A. (2000). Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am. J. Hum. Genet.* *66*, 1398–1402.

O'Donnell, C.D., Tiwari, V., Oh, M.-J., and Shukla, D. (2006). A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* *346*, 452–459.

O'Reilly, M.S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W.S., and Folkman, J. (1999). Antiangiogenic

activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285, 1926–1928.

Oegema, T.R., Kraft, E.L., Jourdian, G.W., and Van Valen, T.R. (1984). Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* 259, 1720–1726.

Ohtake, S., Ito, Y., Fukuta, M., and Habuchi, O. (2001). Human N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase cDNA is related to human B cell recombination activating gene-associated gene. *J. Biol. Chem.* 276, 43894–43900.

Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K. (1999). Human homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274, 22915–22918.

Okayama, M., Kimata, K., and Suzuki, S. (1973). The Influence of  $\alpha$ -Nitrophenyl  $\beta$ -D-Xyloside on the Synthesis of Proteochondroitin Sulfate by Slices of Embryonic Chick Cartilage. *J. Biochem. (Tokyo)* 74, 1069–1073.

Okolicsanyi, R.K., van Wijnen, A.J., Cool, S.M., Stein, G.S., Griffiths, L.R., and Haupt, L.M. (2014). Heparan sulfate proteoglycans and human breast cancer epithelial cell tumorigenicity. *J. Cell. Biochem.* 115, 967–976.

Olczyk, P., Mencner, Ł., and Komosinska-Vassev, K. (2015). Diverse Roles of Heparan Sulfate and Heparin in Wound Repair. *BioMed Res. Int.* 2015, 549417.

Orosco, A., Fromigué, O., Bazille, C., Entz-Werle, N., Levillain, P., Marie, P.J., and Modrowski, D. (2007). Syndecan-2 affects the basal and chemotherapy-induced apoptosis in osteosarcoma. *Cancer Res.* 67, 3708–3715.

Osmani, S.A., Bak, S., and Møller, B.L. (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70, 325–347.

Ozaki, K., Toshikuni, N., George, J., Minato, T., Matsue, Y., Arisawa, T., and Tsutsumi, M. (2014). Serum Endocan as a Novel Prognostic Biomarker in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* 5, 221–230.

Pacheco, B., Maccarana, M., Goodlett, D.R., Malmstrom, A., and Malmstrom, L. (2008). Identification of the Active Site of DS-epimerase 1 and Requirement of N-Glycosylation for Enzyme Function. *J. Biol. Chem.* 284, 1741–1747.

Pak, J.E., and Rini, J.M. (2006). X-ray crystal structure determination of mammalian glycosyltransferases. *Methods Enzymol.* 416, 30–48.

Palmoski, M.J., and Brandt, K.D. (1982). Partial reversal by beta-D-xyloside of salicylate-



- induced inhibition of glycosaminoglycan synthesis in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* *25*, 1084–1093.
- Pap, T., and Bertrand, J. (2013). Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* *9*, 43–55.
- Patterson, A.M., Delday, M.I., van Kuppevelt, T.H., Loh, G., Blaut, M., Haller, D., Grant, G., and Kelly, D. (2012). Expression of heparan sulfate proteoglycans in murine models of experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1112–1126.
- Pejler, G., Abrink, M., and Wernersson, S. (2009). Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 61–68.
- Pejler, G., Bäckström, G., Lindahl, U., Paulsson, M., Dziadek, M., Fujiwara, S., and Timpl, R. (1987). Structure and affinity for antithrombin of heparan sulfate chains derived from basement membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *262*, 5036–5043.
- Petitou, M., Lormeau, J.C., and Choay, J. (1988). Interaction of heparin and antithrombin III. The role of O-sulfate groups. *Eur. J. Biochem. FEBS* *176*, 637–640.
- Pettersson, I., Kusche, M., Unger, E., Wlad, H., Nylund, L., Lindahl, U., and Kjellén, L. (1991). Biosynthesis of heparin. Purification of a 110-kDa mouse mastocytoma protein required for both glucosaminyl N-deacetylation and N-sulfation. *J. Biol. Chem.* *266*, 8044–8049.
- Pineau, N., Bernerd, F., Cavezza, A., Dalko-Csiba, M., and Breton, L. (2008). A new C-xylopyranoside derivative induces skin expression of glycosaminoglycans and heparan sulphate proteoglycans. *Eur. J. Dermatol. EJD* *18*, 36–40.
- Pineau, N., Carrino, D.A., Caplan, A.I., and Breton, L. (2011). Biological evaluation of a new C-xylopyranoside derivative (C-Xyloside) and its role in glycosaminoglycan biosynthesis. *Eur. J. Dermatol. EJD* *21*, 359–370.
- Plaas, A.H., Wong-Palms, S., Roughley, P.J., Midura, R.J., and Hascall, V.C. (1997). Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan. *J. Biol. Chem.* *272*, 20603–20610.
- Praillet, C., Lortat-Jacob, H., Baltzer, F., and Grimaud, J.A. (1996). Distribution of hepatic glycosaminoglycans during acute schistosomiasis: modulation by IFN gamma treatment. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* *42*, 169–177.
- Préchoux, A., Halimi, C., Simorre, J.-P., Lortat-Jacob, H., and Laguri, C. (2015). C5-epimerase and 2-O-sulfotransferase associate in vitro to generate contiguous epimerized and 2-O-sulfated heparan sulfate domains. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1064–1071.

- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilén, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2008). Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4751–4756.
- Pugia, M.J., Valdes, R., and Jortani, S.A. (2007). Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv. Clin. Chem.* *44*, 223–245.
- Qasba, P.K., Ramakrishnan, B., and Boeggeman, E. (2008). Structure and Function of  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase. *Curr. Drug Targets* *9*, 292–309.
- Qin, Y., Ke, J., Gu, X., Fang, J., Wang, W., Cong, Q., Li, J., Tan, J., Brunzelle, J.S., Zhang, C., et al. (2015). Structural and functional study of D-glucuronyl C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *290*, 4620–4630.
- Quentin, E., Gladen, A., Rodén, L., and Kresse, H. (1990). A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1342–1346.
- Rahuel-Clermont, S., Daligault, F., Piet, M.-H., Gulberti, S., Netter, P., Branlant, G., Magdalou, J., and Lattard, V. (2010). Biochemical and thermodynamic characterization of mutated  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 involved in the progeroid form of the Ehlers-Danlos syndrome. *Biochem. J.* *432*, 303–311.
- Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2010). Crystal Structure of the Catalytic Domain of *Drosophila*  $\beta$ 1,4-Galactosyltransferase-7. *J. Biol. Chem.* *285*, 15619–15626.
- Raman, K., and Kuberan, B. (2010). Click-xylosides mitigate glioma cell invasion in vitro. *Mol. Biosyst.* *6*, 1800–1802.
- Raman, K., Ninomiya, M., Nguyen, T.K.N., Tsuzuki, Y., Koketsu, M., and Kuberan, B. (2011). Novel glycosaminoglycan biosynthetic inhibitors affect tumor-associated angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *404*, 86–89.
- Reed, C.C., and Iozzo, R.V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* *19*, 249–255.
- Reed, C.C., Waterhouse, A., Kirby, S., Kay, P., Owens, R.T., McQuillan, D.J., and Iozzo, R.V. (2005). Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene* *24*, 1104–1110.
- Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A.M., Kjellen, L., and Forsberg, E. (2000). Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 25926–25930.

- Robinson, H.C., Brett, M.J., Tralaggaan, P.J., Lowther, D.A., and Okayama, M. (1975). The effect of D-xylose, beta-D-xylosides and beta-D-galactosides on chondroitin sulphate biosynthesis in embryonic chicken cartilage. *Biochem J* 148, 25–34.
- Robinson, J.A., and Robinson, H.C. (1981). Control of chondroitin sulphate biosynthesis. beta-D-Xylopyranosides as substrates for UDP-galactose: D-xylose transferase from embryonic-chicken cartilage. *Biochem J* 194, 839–846.
- Rodén, L., and Armand, G. (1966). Structure of the chondroitin 4-sulfate-protein linkage region. Isolation and characterization of the disaccharide 3-O-beta-D-glucuronosyl-D-galactose. *J. Biol. Chem.* 241, 65–70.
- Rodriguez, E., Roland, S.K., Plaas, A., and Roughley, P.J. (2006). The glycosaminoglycan attachment regions of human aggrecan. *J. Biol. Chem.* 281, 18444–18450.
- Rönnols, J., Manner, S., Siegbahn, A., Ellervik, U., and Widmalm, G. (2013). Exploration of conformational flexibility and hydrogen bonding of xylosides in different solvents, as a model system for enzyme active site interactions. *Org. Biomol. Chem.* 11, 5465–5472.
- Rosenberg, R.D., and Damus, P.S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248, 6490–6505.
- Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mater.* 12, 92–101.
- Saliba, M., Ramalanjaona, N., Gulberti, S., Bertin-Jung, I., Thomas, A., Dahbi, S., Lopin-Bon, C., Jacquinet, J.-C., Breton, C., Ouzzine, M., et al. (2015). Probing the acceptor active site organization of the human recombinant  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 and design of xyloside-based inhibitors. *J. Biol. Chem.* 290, 7658–7670.
- Sanderson, R.D. (2001). Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 89–98.
- Santoso, A., Kikuchi, T., Tode, N., Hirano, T., Komatsu, R., Damayanti, T., Motohashi, H., Yamamoto, M., Kojima, T., Uede, T., et al. (2015). Syndecan 4 Mediates Nrf2-dependent Expansion of Bronchiolar Progenitors That Protect Against Lung Inflammation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Sarkar, A.K., and Esko, J.D. (1995). Synthesis and glycosaminoglycan priming activity of three disaccharides related to the linkage region tetrasaccharide of proteoglycans. *Carbohydr. Res.* 279, 161–171.
- Schaefer, L. (2011). Small leucine-rich proteoglycans in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1200–1207.

- Schaefer, L., and Iozzo, R.V. (2008). Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 283, 21305–21309.
- Schalkwijk, J., Zweers, M.C., Steijlen, P.M., Dean, W.B., Taylor, G., van Vlijmen, I.M., van Haren, B., Miller, W.L., and Bristow, J. (2001). A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N. Engl. J. Med.* 345, 1167–1175.
- Schwartz, N.B., and Dorfman, A. (1975). Effect of beta-D-xylosides on collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1108–1113.
- Schwartz, N.B., Galligani, L., Ho, P.L., and Dorfman, A. (1974). Stimulation of synthesis of free chondroitin sulfate chains by beta-D-xylosides in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4047–4051.
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H., and Yip, G.W. (2012). Serglycin in Health and Diseases. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 295, 1415–1420.
- Seidler, D.G., Faiyaz-Ul-Haque, M., Hansen, U., Yip, G.W., Zaidi, S.H.E., Teebi, A.S., Kiesel, L., and Götte, M. (2006). Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 84, 583–594.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2000). The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* 1, 282–286.
- Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J.W., Dixon, R.A., and Wang, X. (2005). Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 17, 3141–3154.
- Sheng, J., Xu, Y., Dulaney, S.B., Huang, X., and Liu, J. (2012). Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 20996–21002.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., and Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13–22.
- Shworak, N.W., Liu, J., Fritze, L.M., Schwartz, J.J., Zhang, L., Logeart, D., and Rosenberg, R.D. (1997). Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 272, 28008–28019.
- Shworak, N.W., Liu, J., Petros, L.M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Rosenberg, R.D. (1999). Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification

of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* *274*, 5170–5184.

Siegbahn, A., Manner, S., Persson, A., Tykesson, E., Holmqvist, K., Ochocinska, A., Rönnols, J., Sundin, A., Mani, K., Westergren-Thorsson, G., et al. (2014). Rules for priming and inhibition of glycosaminoglycan biosynthesis; probing the  $\beta$ 4GalT7 active site. *Chem. Sci.* *5*, 3501.

Siegbahn, A., Thorsheim, K., Ståhle, J., Manner, S., Hamark, C., Persson, A., Tykesson, E., Mani, K., Westergren-Thorsson, G., Widmalm, G., et al. (2015). Exploration of the active site of  $\beta$ 4GalT7: modifications of the aglycon of aromatic xylosides. *Org. Biomol. Chem.* *13*, 3351–3362.

Sivan, S.S., Wachtel, E., and Roughley, P. (2014). Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 3181–3189.

Sobue, M., Habuchi, H., Ito, K., Yonekura, H., Oguri, K., Sakurai, K., Kamohara, S., Ueno, Y., Noyori, R., and Suzuki, S. (1987). beta-D-xylosides and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. Aglycone-related variation in their effectiveness in vitro and in ovo. *Biochem J* *241*, 591–601.

Sok, J., Pineau, N., Dalko-Csiba, M., Breton, L., and Bernerd, F. (2008). Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new c-xylopyranoside derivative. *Eur. J. Dermatol. EJD* *18*, 297–302.

Song, K., Li, Q., Jiang, Z.-Z., Guo, C.-W., and Li, P. (2011). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* *12*, 388–398.

Sotoodehnejadmatalahi, F., and Burke, B. (2013). Structure, function and regulation of versican: the most abundant type of proteoglycan in the extracellular matrix. *Acta Med. Iran.* *51*, 740–750.

Stearns, K., and Goetinck, P.F. (1979). Stimulation of chondroitin sulfate synthesis by  $\beta$ -D-xyloside in chondrocytes of the proteoglycan deficient mutant nanomelia. *J. Cell. Physiol.* *100*, 33–38.

Stepp, M.A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., and Pajoohesh-Ganji, A. (2015). Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Adv. Wound Care* *4*, 235–249.

Sugahara, K., Yamada, S., and Kitagawa, H. (2001). [Biosynthetic mechanism of sulfated glycosaminoglycans]. *Seikagaku* *73*, 458–470.

Superti-Furga, A., and Steinmann, B. (1989). Ehlers-Danlos syndrome type IV: another temperature-dependent skin disorder? *J. Am. Acad. Dermatol.* *21*, 323.

- Szatmári, T., Ötvös, R., Hjerpe, A., and Dobra, K. (2015). Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. *Dis. Markers* 2015, 796052.
- Takagaki, K., Nakamura, T., Kon, A., Tamura, S., and Endo, M. (1991). Characterization of beta-D-xyloside-induced glycosaminoglycans and oligosaccharides in cultured human skin fibroblasts. *J. Biochem. (Tokyo)* 109, 514–519.
- Takemae, H., Ueda, R., Okubo, R., Nakato, H., Izumi, S., Saigo, K., and Nishihara, S. (2003). Proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta 1,4-galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 278, 15571–15578.
- Talhaoui, I., Bui, C., Oriol, R., Mulliert, G., Gulberti, S., Netter, P., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2010). Identification of key functional residues in the active site of human {beta}1,4-galactosyltransferase 7: a major enzyme in the glycosaminoglycan synthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 37342–37358.
- Tang, B.L., Wong, S.H., Low, S.H., and Hong, W. (1992). The transmembrane domain of N-glucosaminyltransferase I contains a Golgi retention signal. *J. Biol. Chem.* 267, 10122–10126.
- Tatari, H. (2007). The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* 41 Suppl 2, 1–5.
- Tazawa, T., Takagaki, K., Matsuya, H., Nakamura, T., Sasaki, M., and Endo, M. (1998). A novel 4-methylumbelliferyl-beta-D-xyloside derivative, sulfate-O-3-xylosylbeta1-(4-methylumbelliferone), isolated from culture medium of human skin fibroblasts, and its role in methylumbelliferone-initiated glycosaminoglycan biosynthesis. *Glycobiology* 8, 879–884.
- 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.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Neill, T., Mulhaupt, H.A.B., Hubo, M., Frey, H., Gopal, S., Gomes, A., Afratis, N., Lim, H.C., et al. (2015). Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochim. Biophys. Acta* 1855, 276–300.
- Thibodeaux, C.J., Melançon, C.E., and Liu, H. (2007). Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature* 446, 1008–1016.
- Thibodeaux, C.J., Melançon, C.E., and Liu, H. (2007). Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature* 446, 1008–1016.
- Thorsøe, K.S., Bak, S., Olsen, C.E., Imberty, A., Breton, C., and Lindberg Møller, B. (2005). Determination of catalytic key amino acids and UDP sugar donor specificity of the cyanohydrin glycosyltransferase UGT85B1 from *Sorghum bicolor*. Molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. *Plant Physiol.* 139, 664–673.

Tímár, J., Diczházi, C., Bartha, I., Pogány, G., Paku, S., Rásó, E., Tóvári, J., Ladányi, A., Lapis, K., and Kopper, L. (1995). Modulation of heparan-sulphate/chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int. J. Cancer* *62*, 755–761.

Tiwari, V., O'Donnell, C.D., Oh, M.-J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2005). A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 930–937.

Tone, Y., Pedersen, L.C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J.-I., Negishi, M., and Sugahara, K. (2008). 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 16801–16807.

Tsutsui, Y., Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2013). Crystal structures of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 7 enzyme reveal conformational changes and substrate binding. *J. Biol. Chem.* *288*, 31963–31970.

Tsuzuki, Y., Nguyen, T.K.N., Garud, D.R., Kuberan, B., and Koketsu, M. (2010). 4-deoxy-4-fluoro-xyloside derivatives as inhibitors of glycosaminoglycan biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *20*, 7269–7273.

Uyama, T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J., Ogawa, T., and Sugahara, K. (2003). Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* *278*, 3072–3078.

Van Hul, W., Wuyts, W., Hendrickx, J., Speleman, F., Wauters, J., De Boule, K., Van Roy, N., Bossuyt, P., and Willems, P.J. (1998). Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family. *Genomics* *47*, 230–237.

Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B.P. (2009). Glycosylation Changes in Cancer. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.

Vassal-Stermann, E., Durantou, A., Black, A.F., Azadiguan, G., Demaude, J., Lortat-Jacob, H., Breton, L., and Vivès, R.R. (2012). A New C-Xyloside induces modifications of GAG expression, structure and functional properties. *PloS One* *7*, e47933.

Venero Galanternik, M., Kramer, K.L., and Piotrowski, T. (2015). Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate Fgf Signaling and Cell Polarity during Collective Cell Migration. *Cell Rep.* *10*, 414–428.

- Vijaya Kumar, A., Salem Gassar, E., Spillmann, D., Stock, C., Sen, Y.-P., Zhang, T., Van Kuppevelt, T.H., Hülsewig, C., Koszłowski, E.O., Pavao, M.S.G., et al. (2014). HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness via MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *Int. J. Cancer* *135*, 2579–2592.
- Vynios, D.H. (2014). Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *BioMed Res. Int.* *2014*, 452315.
- Waaaijer, C.J.F., de Andrea, C.E., Hamilton, A., van Oosterwijk, J.G., Stringer, S.E., and Bovée, J.V.M.G. (2012). Cartilage tumour progression is characterized by an increased expression of heparan sulphate 6O-sulphation-modifying enzymes. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *461*, 475–481.
- Walenga, J.M., Jeske, W.P., Samama, M.M., Frapaise, F.X., Bick, R.L., and Fareed, J. (2002). Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent. *Expert Opin. Investig. Drugs* *11*, 397–407.
- Wang, L., Maniglia, C.A., Mella, S.L., and Sartorelli, A.C. (1983). Synthesis of N-(Substituted-phenyl)-D-xylopyranosylamines as potential modifiers of the formation of glycosaminoglycans. *J. Med. Chem.* *26*, 629–632.
- Wei, G., Bai, X., Sarkar, A.K., and Esko, J.D. (1999). Formation of HNK-1 determinants and the glycosaminoglycan tetrasaccharide linkage region by UDP-GlcUA:Galactose beta1, 3-glucuronosyltransferases. *J. Biol. Chem.* *274*, 7857–7864.
- Weijers, C.A.G.M., Franssen, M.C.R., and Visser, G.M. (2008). Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* *26*, 436–456.
- Wenstrup, R.J., Langland, G.T., Willing, M.C., D'Souza, V.N., and Cole, W.G. (1996). A splice-junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro alpha 1(V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I). *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1733–1736.
- Williams, G.M., and Sah, R.L. (2011). In vitro modulation of cartilage shape plasticity by biochemical regulation of matrix remodeling. *Tissue Eng. Part A* *17*, 17–23.
- Wise, C.A., Clines, G.A., Massa, H., Trask, B.J., and Lovett, M. (1997). Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Res.* *7*, 10–16.
- Woulfe, D.S., Lilliendahl, J.K., August, S., Rauova, L., Kowalska, M.A., Abrink, M., Pejler, G., White, J.G., and Schick, B.P. (2008). Serglycin proteoglycan deletion induces defects in platelet aggregation and thrombus formation in mice. *Blood* *111*, 3458–3467.
- Wu, Y.I., Sheffield, W.P., and Blajchman, M.A. (1994). Defining the heparin-binding domain



of antithrombin. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 5, 83–95.

Wu, Z.L., Lech, M., Beeler, D.L., and Rosenberg, R.D. (2004). Determining heparan sulfate structure in the vicinity of specific sulfotransferase recognition sites by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 279, 1861–1866.

Wuyts, W., Van Hul, W., Hendrickx, J., Speleman, F., Wauters, J., De Boulle, K., Van Roy, N., Van Agtmael, T., Bossuyt, P., and Willems, P.J. (1997). Identification and characterization of a novel member of the EXT gene family, EXTL2. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 5, 382–389.

Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J.-P., Malmstrom, A., Shukla, D., and Liu, J. (2002). Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* 277, 37912–37919.

Xu, D., Moon, A.F., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2008). Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nat. Chem. Biol.* 4, 200–202.

Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005). Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem. J.* 385, 451–459.

Xu, R., Rudd, T.R., Hughes, A.J., Siligardi, G., Fernig, D.G., and Yates, E.A. (2013). Analysis of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) signalling network with heparin as coreceptor: evidence for the expansion of the core FGFR signalling network. *FEBS J.* 280, 2260–2270.

Xu, X., Rao, G., Quiros, R.M., Kim, A.W., Miao, H.-Q., Brunn, G.J., Platt, J.L., Gattuso, P., and Prinz, R.A. (2007). In vivo and in vitro degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans by HPR1 in pancreatic adenocarcinomas. Loss of cell surface HS suppresses fibroblast growth factor 2-mediated cell signaling and proliferation. *J. Biol. Chem.* 282, 2363–2373.

Yada, T., Sato, T., Kaseyama, H., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Togayachi, A., Kudo, T., Watanabe, H., et al. (2003). Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 278, 39711–39725.

Yamagata, E., and Kamada, A. (1999). Expression of the cell-surface heparan sulfate proteoglycan mRNA in monkey submandibular gland. *J. Osaka Dent. Univ.* 33, 83–87.

Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K., and Habuchi, O. (2000). Molecular cloning and expression of chondroitin 4-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 275, 8975–8981.

Yang, J., Yang, Q., Yu, S., and Zhang, X. (2015). Endocan: A new marker for cancer and a target for cancer therapy. *Biomed. Rep.* 3, 279–283.

Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R.B., Linhardt, R.J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H.,

and McKeehan, W.L. (2001). Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 14429–14439.

Zhang, L., and Esko, J.D. (1994). Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 269, 19295–19299.

Zhang, L., Beeler, D.L., Lawrence, R., Lech, M., Liu, J., Davis, J.C., Shriver, Z., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R.D. (2001). 6-O-sulfotransferase-1 represents a critical enzyme in the anticoagulant heparan sulfate biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 42311–42321.

Zhao, W., Sun, M., Li, S., Wang, Y., and Liu, J. (2014). Biological and clinical implications of endocan in gastric cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 10043–10049.

## Recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les enzymes de biosynthèse des glycosaminoglycanes

Les glycosyltransférases (GTs) sont une famille importante d'enzymes responsable de la biosynthèse des chaînes de glycosaminoglycane (GAG) des protéoglycanes, composants clés de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique cellulaire impliqués dans la communication, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires. Les GTs jouent donc un rôle central dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques tels que les cancers ou encore les maladies dégénératives et génétiques. Parmi ces GTs, la  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase 7 ( $\beta$ 4GalT7) est une cible thérapeutique potentielle puisqu'elle : i) catalyse une étape précoce et majeure de la biosynthèse des chaînes de GAG, ii) est impliquée dans une forme rare de maladie génétique des tissus conjonctifs, le syndrome d'Ehlers-Danlos, iii) prend en charge des xylosides exogènes modulant son activité *in vitro* et *in vivo*. Ce travail de thèse s'organise sur une étude structure/fonction de cette enzyme afin de cerner les résidus d'acides aminés clés dans l'interaction de l'enzyme avec un substrat modèle, le 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose (4-MOX). Les résidus Y194, Y196 et Y199 ont ainsi été identifiés comme clés dans l'architecture du site de fixation du substrat accepteur et dans l'interaction de l'enzyme avec le xyloside. Au contraire, les résidus H195, R226 et le résidu R270, muté dans la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos, apparaissent comme des résidus « modulant » l'activité de l'enzyme, notamment du fait d'interactions moléculaires impliquant leur squelette peptidique pour H195 et R226 et une boucle flexible pour R270. Ces travaux ont permis de guider la synthèse d'analogues xylosidiques visant à inhiber l'activité de la  $\beta$ 4GalT7 humaine. Parmi les propositions, un dérivé fluoré du 4-MOX apparaît comme un inhibiteur efficace de la  $\beta$ 4GalT7 *in vitro* et *in cellulo*. Faiblement cytotoxique, ce dérivé réduit la prolifération des cellules de lignées cancéreuses SW1353 et MB MDA 231. Ces résultats ouvrent la perspective de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant les xylosides comme agents potentiels dans le traitement de cancers ou encore des maladies génétiques des tissus conjonctifs.

**Mots-clés :** glycosyltransférases, glycosaminoglycanes, xylosides, structure/fonction, stratégies thérapeutiques.

## Search for new therapeutic strategies targeting glycosaminoglycan biosynthetic enzymes

Glycosyltransferases (GTs) are an important family of enzymes involved in the biosynthesis of glycosaminoglycan (GAG) chains of proteoglycans which are key components of cell plasma membranes and of the extracellular matrix, and are thus implicated in cell communication, adhesion, migration and proliferation. GTs are thus key players in numerous pathophysiological processes such as cancers, degenerative and genetic diseases. Among these GTs,  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 ( $\beta$ 4GalT7) is a potential therapeutic target since : i) it catalyzes a rate-limiting step in the early phase of the GAG chains biosynthesis, ii) it is implicated in a rare genetic connective tissue disorder (Ehlers-Danlos Syndrome), iii) its *in vitro* and *in vivo* activity can be modulated by exogenous xyloside molecules. This PhD work is focused on a structure/function study of the enzyme aiming to identify key amino acid residues that interact with 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose (4-MUX), taken as reference substrate. Y194, Y196 and Y199 have been identified as key residues for the architecture of the acceptor substrate binding site and establish interactions with 4-MUX. By contrast, H195, R226 and R270, a residue mutated in the progeroid form of Ehlers-Danlos Syndrome, should rather be considered as “modulating” residues towards the  $\beta$ 4GalT7 activity, H195 and R226 interacting with 4-MUX with their polypeptide backbone, and R270 via a flexible loop. This work guided the design of xylosidic compounds that would potentially inhibit the  $\beta$ 4GalT7 activity. Thus, a fluorinated derivative of 4-MUX appeared as an efficient *in vitro* and *in cellulo* inhibitor of the enzyme. Poorly cytotoxic, this compound also reduced the proliferation rate of cancer cells SW1353 and MB MDA 231. Altogether, these results offer new therapeutic strategies using xylosides as potential therapeutic agents in the treatment of cancer or rare genetic disorders.

**Key words:** glycosyltransferases, glycosaminoglycans, xylosides, structure/function, therapeutic strategies.