

L'apport de la glycobiotechnologie au domaine de la santé

The contribution of glycobiotechnology to the main stream of biomedical field

Bernard Priem¹, Serge Pérez²

¹ Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, UPR 5301, associé à UGA, Grenoble, France, bernard.priem@cermav.cnrs.fr

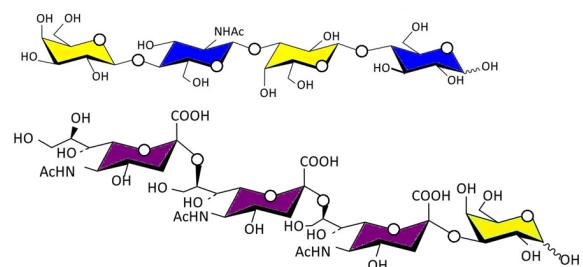
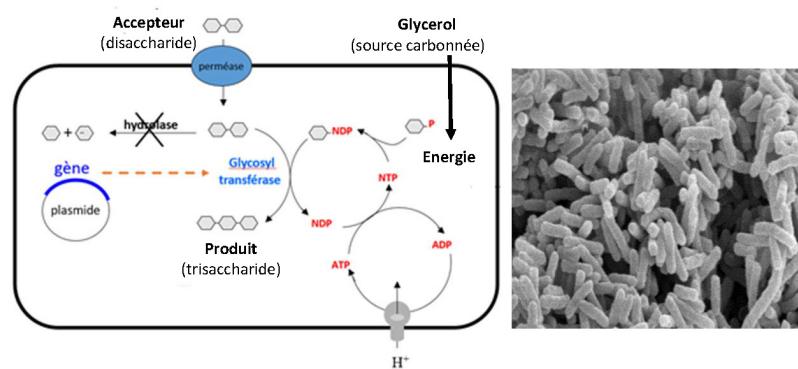
² Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR 5063, UGA, CNRS, Grenoble, France, spsergeperez@gmail.com

RÉSUMÉ. Les glycanes (glucides complexes) jouent un rôle important dans de nombreux processus importants sur le plan biomédical, tels que la réponse inflammatoire, l'activité hormonale, la malignité, les infections virales et bactériennes et la différenciation cellulaire. Cet article de synthèse présente l'apport de la glycobiotechnologie au domaine de la santé. Alors que plusieurs méthodes sont décrites pour produire des quantités importantes d'oligosaccharides bio-actifs, d'autres facettes abordent les problèmes liés à la glycosylation d'anticorps thérapeutiques et à la complexité des glycosaminoglycans. La situation actuelle des vaccins à base de polysaccharides est également présentée. Leur succès ouvre des voies nouvelles de développement de nouveaux vaccins à base d'oligosaccharides contre d'autres agents pathogènes tels que les virus (VIH), les champignons, les parasites protozoaires ou les helminthes, et la génération des premiers vaccins anti-cancer.

ABSTRACT. Complex carbohydrates play an important role in many biomedically important processes, including inflammatory response, hormone action, malignancy, viral and bacterial infections and cell differentiation. This review article enlights how glycobiotechnology is contributing to the mainstream of biomedical field. While several methods are described to produce large-scale quantities of bio-active oligosaccharides, other facets address the challenge of the glycosylation of therapeutic antibodies and the complexity of glycosaminoglycans. The present state of carbohydrate-based vaccines is presented as an opening to the on-going development of new vaccines focusing on carbohydrate-based vaccines against other pathogens such as viruses (HIV), fungi, protozoan parasites, or helminths as well as cancer.

MOTS-CLÉS. Glycosylation, Oligosaccharides, Bactéries Recombinantes, Glycoconjugués, Anticorps thérapeutiques, Glycosaminoglycans, Vaccins.

KEYWORDS. Glycosylation, Oligosaccharides, Recombinant bacteria, Glycoconjugates, Therapeutic Antibodies, Glycosaminoglycans, Vaccines.



1. Introduction

Les glycosciences regroupent l'ensemble des disciplines scientifiques qui étudient les glucides complexes ou glycanes. Le terme glycane (du grec γλυκός) est employé pour décrire des molécules composées de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique. Les glycanes existent sous forme d'oligo et polysaccharides et peuvent être attachés à d'autres molécules biologiques pour

former des glycolipides, des glycoprotéines et des protéoglycans. Ces molécules et macromolécules peuvent exister sous formes de structures linéaires, branchées ou cycliques. Elles sont présentes dans tous les règnes du vivant et sont les plus abondantes de la biosphère. De nature et de composition extrêmement complexes, les glycans ont longtemps rebuté les biologistes, et malgré quelques applications pharmaceutiques et thérapeutiques, sont restés à l'écart des développements scientifiques et technologiques majeurs jusque dans les années 1960. Leur rôle clé en tant que messagers de l'information biologique n'est apparu que tardivement.

Comme pour la plupart des biomolécules, les processus biosynthétiques des glycans s'effectuent en empruntant la voie du réticulum endoplasmique puis de l'appareil de Golgi. Des assemblages et modifications sont effectués par diverses enzymes dans le cytoplasme ou la membrane plasmique. L'insertion des macromolécules ainsi synthétisées dans des granules de sécrétion conduit à leur ancrage membranaire à la surface cellulaire en association avec des lipides ou des protéines ou à leur libération dans la matrice extracellulaire.

Les glycoprotéines sont d'importance sur un plan biologique. Ces structures se retrouvent dans tous les fluides de l'organisme, et ont des fonctions de reconnaissance (enzymes, anticorps,...) aussi bien dans le milieu extracellulaire que dans le secteur intracellulaire. Les protéoglycans sont des glycoprotéines constituées de chaînes protéiques sur lesquelles sont greffées de manière covalente des chaînes de polysaccharides dénommées glycosaminoglycans (GAG). Synthétisés par les cellules animales, les GAGs ont une localisation intracellulaire, membranaire et péricellulaire ; ils diffèrent selon leur origine tissulaire et cellulaire. Les glycolipides sous forme de glycéroglycolipides et de sphingoglycolipides sont des constituants membranaires qui jouent un rôle de reconnaissance important. Les glycans sont des acteurs pathologiques clés d'événements extra- et inter-cellulaires et ont un rôle central dans différents systèmes et contextes biologiques et thérapeutiques.

La prise de conscience de l'importance de ces propriétés et fonctions est à l'origine des développements récents qu'ont connues les glycosciences. Elle confère à l'étude de cette famille de molécules et macromolécules biologiques un rôle important au plan cognitif et applicatif et constituent des champs de recherche et de développements biotechnologiques.

Les glycans représentent des médicaments potentiels dans les traitements de cancers (métastase, cancer du poumon, du côlon, du sein, des ovaires...), de l'inflammation (lésions dues à la reperfusion, allergie, asthme, arthrite), de maladies cardiovasculaires (thrombose, attaques ischémiques ou hémorragies), de diabète (type I et II). D'autres domaines d'applications sont envisagés : infection bactérienne (du nouveau-né, ulcère de l'estomac, infections gastriques), infection virale (grippe, SIDA, ...), stimulation immune, infection postopératoire, blessure, maladie neurologique (épilepsie, maladie de Parkinson) ou allo- et xénotransplantation.

Les glycans ont d'autres applications dans les domaines de la nutrition humaine et animale, et l'agriculture. Dans la majorité des exemples documentés à ce jour, les glycans présentant une activité thérapeutique ne dépassent pas la taille d'un pentasaccharide. Dans le cas des virus de la grippe, l'identification des interactions mises en jeu entre les glycoprotéines de surface vitales, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N) et les structures glucidiques impliquées dans la pénétration du virus et de la libération des virions formés, a conduit à la synthèse de l'oseltamivir (Tamiflu) ® et du zanamivir (Relenza) ® qui sont des inhibiteurs de la neuraminidase.

2. Les oligosaccharides

Les étapes importantes des régulations biologiques impliquent le plus souvent des processus de reconnaissance entre des glycans et des protéines. L'identification, la caractérisation et l'élucidation des glycans qui sont impliqués dans ces interactions moléculaires constituent un enjeu majeur dont les progrès sont limités par des difficultés à la fois de nature biologique et analytique. Les glycans ne

peuvent être directement préparés par des voies de recombinaison génétique ni être amplifiés par des méthodes telles que la Réaction en Chaîne par Polymérase. Les méthodes d'extraction à partir de sources naturelles conduisent à des mélanges en tailles et en structures et ne permettent pas toujours l'obtention de quantités suffisantes de glycane purifiés.

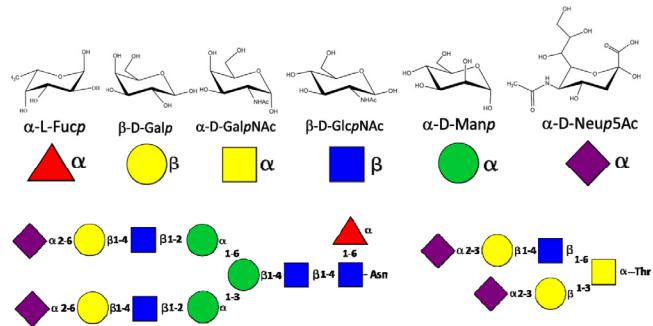


Figure 1. Représentations schématiques des motifs saccharidiques constitutifs des structures de glycane liés à des protéines : N-glycane (liaison à l'Asparagine) et O-glycane (liaison à la Thréonine et à la Sérine). A la représentation chimique est associée une représentation graphique qui décrit la nature du monosaccharide (couleur), ses substituants (forme). Cette représentation symbolique, est dénommée SNFG (Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans) [1].

De nombreuses recherches ont été dévolues aux développements de méthodes de couplages osidiques, qui sont les opérations fondamentales dans la synthèse des oligosaccharides. Cependant, ces méthodes se heurtent aux nombreuses étapes de protection-déprotection nécessaires et parfois au manque de sélectivité lors de la formation de certaines liaisons glycosidiques. Les durées de synthèse, qui sont pour un tétra- ou un pentasaccharide de quelques semaines à quelques mois, sont également les facteurs limitants de cette voie. La grande diversité des structures possibles et la complexité de la chimie des glycane font que ce n'est que récemment que la synthèse de glycane sur support solide, totalement automatisée, a connu un développement important. La figure 2 représente le schéma de principe de la synthèse automatique sur support solide [2] [3] alors que la figure 3 en décrit l'application à la synthèse d'un hexamère de sulfate de chondroitine [4].

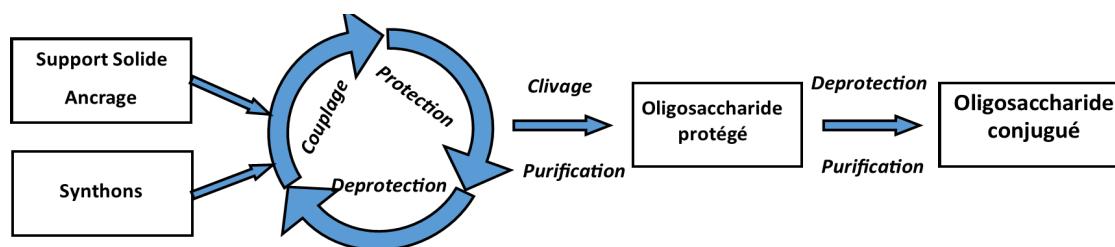


Figure 2. Principe de la synthèse automatique de glycane sur support solide [2].

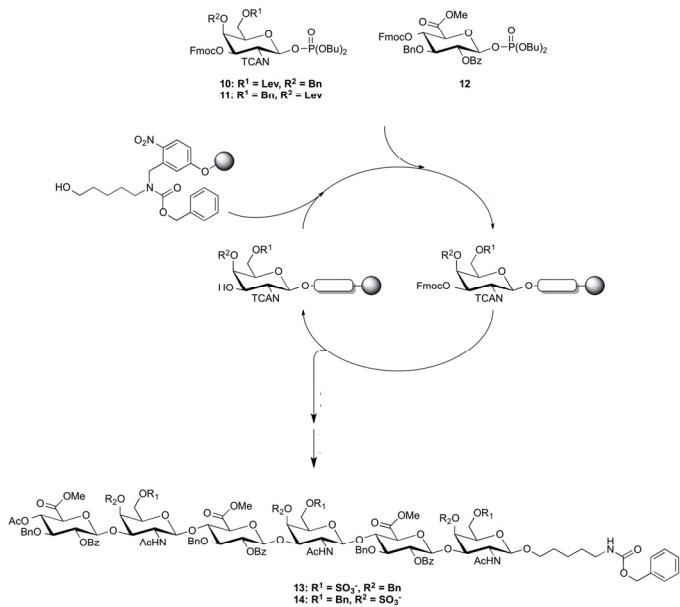


Figure 3. Synthèse d'un hexamère de sulfate de chondroïtine (adaptée de la référence 4).

La synthèse chimio-enzymatique est une alternative séduisante qui utilise l'intercalation d'étapes enzymatiques dans la suite des séquences des réactions chimiques. Elle répond à un des problèmes précédents puisqu'une glycosylation enzymatique offre un degré élevé de stéréo- et de régiospécificité. Trois classes d'enzymes peuvent être utilisées. Les glycosyl-transférases (GT), dites « Leloir » permettent de mimer la biosynthèse; ces enzymes utilisent comme donneur un sucre activé par des nucléotides (NDP) qu'elles transfèrent sur un accepteur (X) de nature glucidique ou non.

Les glycosyl-transférases peuvent être produites de manière recombinante, et leur utilisation nécessite d'accéder aux nucléotides –sucré ou à des analogues. Cette approche permet de contrôler la nature et la stoechiométrie des réactants. Une autre classe d'enzymes, les glycosyl-transférases « non-Leloir » peut être utilisée. Elles nécessitent l'utilisation de donneurs activés non-nucléotidiques. Généralement un seul résidu glycosyle est transféré, ce qui limite l'application de cette méthode. Les hydrolases (glycosidases, glycanases) constituent la troisième classe d'enzymes. Des réactions de trans-glycosylation dans des milieux hydro-organiques, conduisent à l'obtention d'oligosaccharides naturels, ou non, plus ou moins complexes. L'utilisation conjointe de glycosyl-nucléotides et de glycosyl-transférases, isolées de sources naturelles, conduit à des rendements tout à fait acceptables. Toutefois, ces enzymes sont encore peu disponibles en nombre.

La synthèse dite « microbiologique », ou d'ingénierie métabolique, est à l'origine de réalisations qui dans le domaine des glycans des surfaces cellulaires, conjuguent à la fois précision et rapidité dans l'obtention de molécules en quantités suffisantes pour de nombreuses applications technologiques. Ce procédé de trans-conversion microbiologique d'un précurseur exogène s'est avéré extrêmement efficace pour produire des glycans à l'échelle de plusieurs grammes par litre de milieu de culture de micro-organismes recombinants [5].

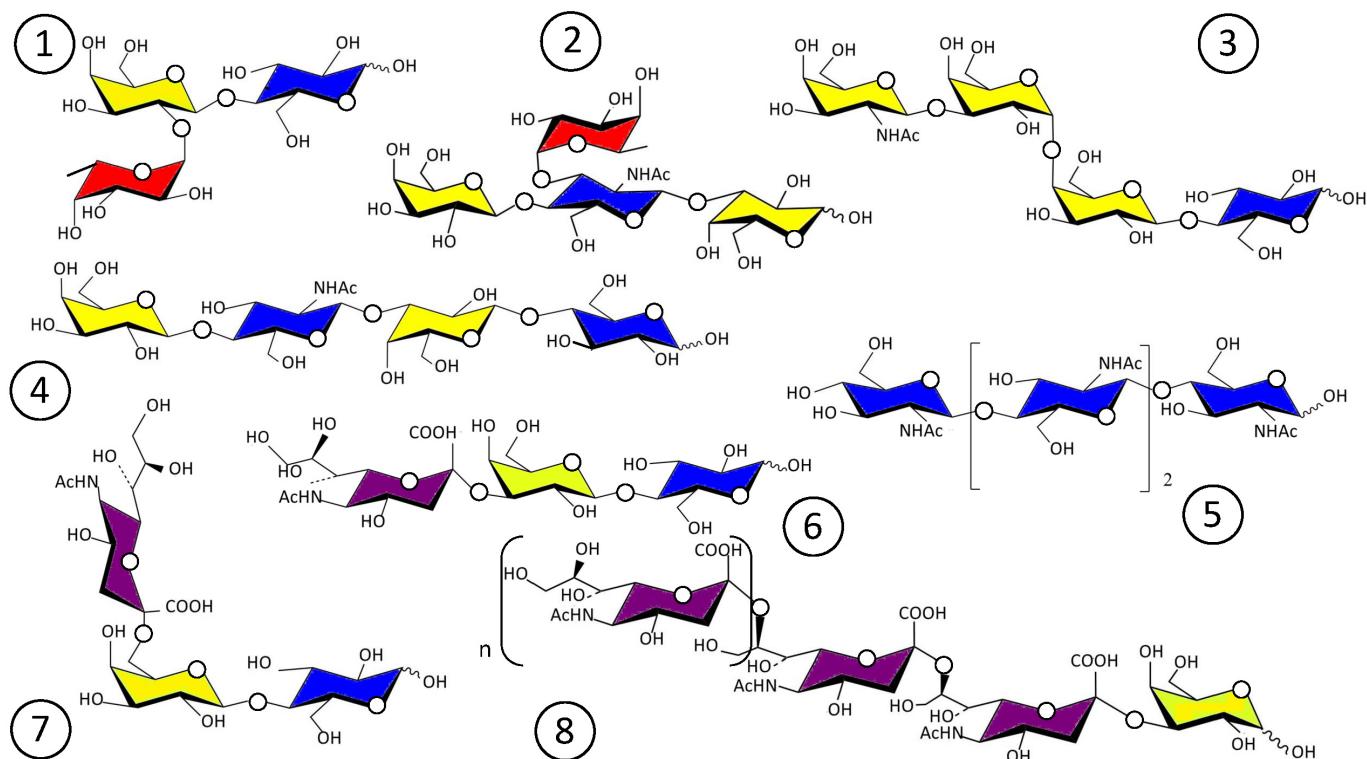


Figure 4. Représentation schématique des structures de quelques glycane s produits par ingénierie métabolique chez *Escherichia coli* recombinant.

- ① 2'-fucosyllactose (HMO) [7]
- ② Lewis X (groupe tissulaire) [8]
- ③ Globotetraose (glycosphingolipides) [9]
- ④ Lacto-*N*-néotétraose (HMO) [6]
- ⑤ Chitotetraose [5]
- ⑥ 3-sialyllactose(GangliosideGM₃) [8]
- ⑦ 6-sialyllactose (HMO) (10) [10]
- ⑧ Acide polysialique (système nerveux) [11]

- Fucp- α -2Galp- β -4GlcP
- Galp- β -4[Fucp α -3]GlcPNAc- β -3Galp
- GalpNAc- β -3Galp- α -4Galp- β -4GlcP
- Galp- β -4GlcPNAc- β -3Galp- β -4GlcP
- GlcPNAc- β -4[GlcPNAc- β -4]₃GlcPNAc
- Neup5Ac- α -3Galp- β -4GlcP
- Neup5Ac- α -6Galp- β -4GlcP
- [Neup5Ac- α -8]_nNeup5Ac- α -3Galp (10n>30)

De très nombreuses structures de groupes sanguins, et de gangliosides, ont été produites avec succès par des bactéries recombinantes et font l'objet d'applications industrielles. Parmi celles-ci figurent les oligosaccharides présents dans le lait maternel humain provenant de la glycosylation du lactose (Human Milk Oligosaccharides, HMO) [6]. (figure 4).

Les HMO présentent des propriétés pré-biotiques et protègent efficacement l'intestin contre les germes pathogènes, d'où l'intérêt de pouvoir les produire à l'échelle industrielle. Leur ajout dans les formulations de poudre de lait pour nourrisson est en phase de démarrage sur le marché nord-américain et en Espagne où une formule de lait contenant deux HMO est désormais disponible dans les hôpitaux et les pharmacies.

Le procédé de synthèse microbiologique est basé sur l'internalisation d'un précurseur ou « accepteur de glycosylation » ajouté dans le milieu de culture. Le précurseur internalisé non métabolisable est

modifié dans la bactérie. Il constitue le point de départ de la biosynthèse d'un oligosaccharide dont la nature dépendra du choix des enzymes recombinantes exprimées dans la bactérie (figure 5).

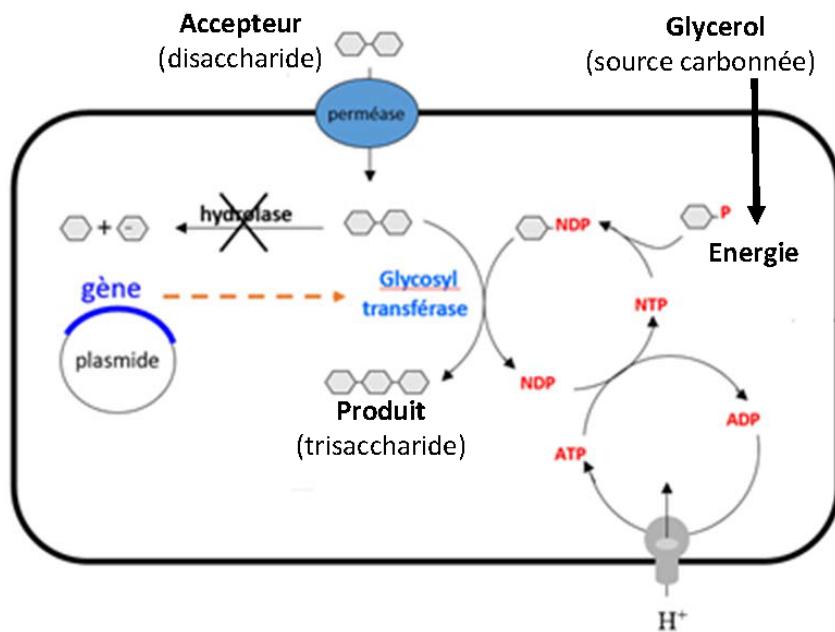


Figure 5. Procédé de synthèse microbiologique à partir d'un précurseur de glycosylation.

L'accepteur ajouté dans le milieu de culture est internalisé dans la bactérie par un transporteur spécifique. La bactérie mutée ne peut pas dégrader l'accepteur ce qui permet sa glycosylation dans le cytoplasme sous l'action de glycosyltransférases recombinantes. La source carbonée apporte l'énergie nécessaire à la synthèse et au recyclage des nucléotide-sucres précurseurs de biosynthèse.

Une fois obtenus, les glycanes peuvent être utilisés seuls (c'est le cas des pré-biotiques) mais sont le plus souvent conjugués à une autre molécule ou à une surface. Une réaction de couplage est alors nécessaire et il existe une variété de méthodes, le plus souvent chimiques, permettant la fixation covalente des glycanes.

Source	Enzyme(s) (nom)	Produits de réaction/accepteur
<i>Escherichia coli</i>	β -1,4-galactosyltransférase (LgtB) β -1,3-N-acetyl glucosaminyl transférase (LgtA)	Galp- β -4 GlcpNAc GlcpNAc- β -3 Galp
<i>Helicobacter pylori</i>	α -1,2-fucosyltransférase (FutC) α -1,3-fucosyltransférase (FutA)	Fucp- α -2 Galp Fucp- α -3 Galp
<i>Campylobacter jejuni</i>	α -2,3-sialyltransférase (nst)	Neup5Ac- α -3 Galp
<i>Photobacterium damsela</i>	α -2,6-sialyltransférase (6ST)	Neup5Ac- α -6 Galp Neup5Ac- α -6 GlcpNAc
<i>Escherichia coli K1</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	α -2,8-polysialyltransférase (PST)	[Neup5Ac- α -8] _n Neup5Ac- α -3 Galp

Tableau 1. Exemples d'enzymes bactériennes utilisées comme outil de synthèse enzymatique de structures glucidiques animales.

La technique de couplage la plus couramment employée pour former des glycoconjugués de type glycoprotéines ou glycopeptides est l'amination réductrice. Celle-ci consiste à utiliser les groupements amines naturellement présents sur les protéines au niveau de l'extrémité N-terminale et des chaînes latérales de résidus des lysines, et la fonction aldéhyde de l'extrémité réductrice des oligosaccharides [12][13].

L'amine réagit avec le carbonyle pour former un ion iminium par une condensation qui libère une molécule d'eau. L'ion iminium est ensuite réduit par le cyanoborohydrure de sodium (figure 6). La structure cyclique du monosaccharide réducteur n'étant pas conservée, l'activité biologique de l'oligosaccharide couplé peut alors s'en trouver diminuée.

En 2001, Petrassi a montré que la cyclo-addition 1,3-dipolaire azoture-alcyne était accélérée par une catalyse au cuivre [14]. Il a également été remarqué que cette catalyse rendait la réaction régio-sélective. Cette réaction CuAAC a alors connu un essor et a introduit le concept de « chimie click » [15]. Cette chimie repose sur l'utilisation de deux blocs fonctionnels réactifs et modulables pour le couplage sélectif de deux entités. Une liste de conditions à satisfaire a été établie pour définir les conditions de « chimie click ». Elles doivent être: (1) Modulables; (2) De hauts rendements; (3) Stéréo-sélectives; (4) Tolérantes à l'eau, l'oxygène et aux autres groupes fonctionnels; (5) Ne nécessitant aucun groupement protecteur; (6) Thermodynamiquement favorable; (7) Ne générant pas de sous-produits, ou alors non toxiques et éliminables. En général, les réactions remplissant ces critères regroupent les cyclo-additions, les substitutions nucléophiles sur des cycles contraints, les additions de nucléophiles activés sur les carbonyles ou les additions sur des substrats insaturés.

Il est également recommandé que ces réactions se fassent dans des conditions réactionnelles simples, n'utilisant pas de solvants organiques toxiques et difficilement éliminables et soient mises au point à partir de réactifs commerciaux ou aisés à préparer.

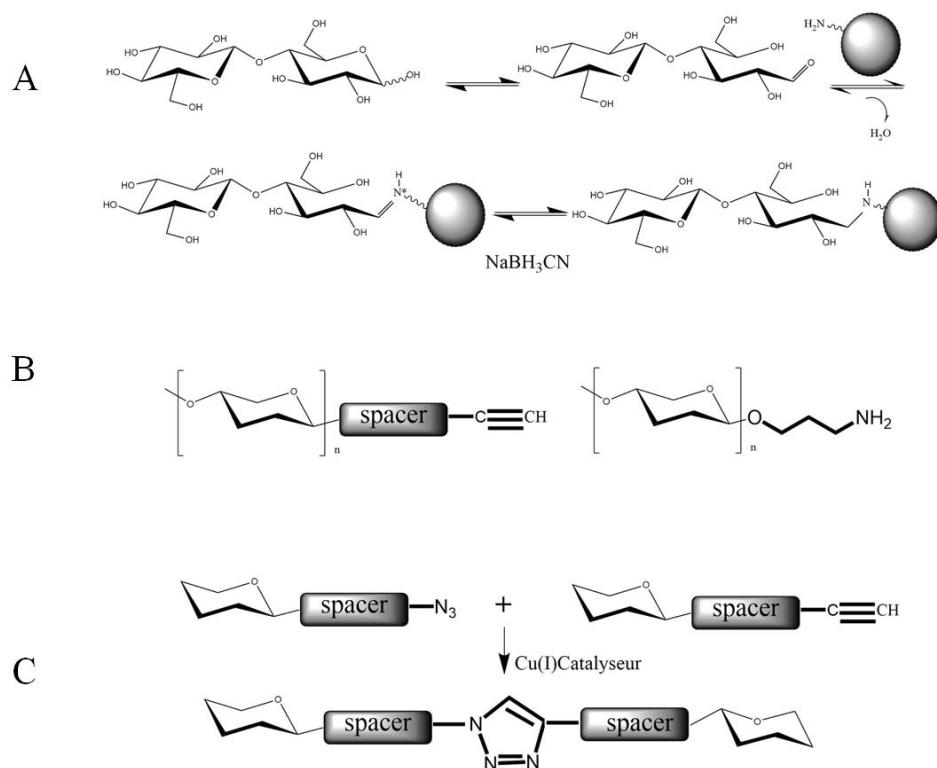


Figure 6. Illustration de voies chimiques permettant la conjugaison de glycanes. A. Amination réductrice pour former des glycoconjugués de type glycoprotéines ou glycopeptides. B. Deux voies possibles d'obtention de glycanes activés au moyen soit d'un bras espaceur lié à un groupement propargyl ou soit d'un bras aminopropyle. C. Exemple d'application de la chimie-click pour former des architectures macromoléculaires ou immobiliser les glycanes sur des « puces à sucre ».

Un élément intéressant de la synthèse microbiologique est de permettre l'utilisation d'un précurseur portant un groupement réactif facilitant la conjugaison. Différents précurseurs portant une fonction allyle, propargyel, ou furyle ont été utilisés comme précurseurs de biosynthèse dans des bactéries[16][17]. Les glycanes ainsi produits portent également ces groupements, ce qui facilite grandement leur utilisation pour l'élaboration de glycoconjugués. Leur utilisation dans des développements vaccinaux est également importante. Une fois synthétisés et caractérisés pour leur pureté, ces glycanes peuvent faire l'objet de nombreuses applications. Ils peuvent être mis en œuvre en tant que molécules isolées pour leur propriétés thérapeutiques ou nutritionnelles. Ils peuvent aussi être les éléments constitutifs de constructions et architectures plus complexes, telles que les « puces à sucres » utilisées à des fins diagnostiques, ou des structures multivalentes à partir de châssis moléculaires appropriés [18], tels que des nanoparticules d'or [19] permettant de mettre en action les propriétés de multivalence [20].

3. Glycosylation des anticorps thérapeutiques

Les anticorps thérapeutiques sont des glycoprotéines présentant les N-glycans en position Asn-297. La N-glycosylation est indispensable pour l'activité effectrice des anticorps, qui ont une double fonction. Ils permettent l'activation de la voie du complément (voie CDC –Complement-Dependent-Cytotoxicity). Ils sont aussi indispensables dans les interactions avec les récepteurs Fcγ assurant ainsi la destruction des protéines ou des cellules cibles (voie ADCC – Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity) (figure 7). Au sein de ces structures, deux motifs mono-saccharidiques jouent un rôle essentiel. L'absence de fucose augmente l'ADCC, ce qui a pour conséquence d'induire un effet pro-inflammatoire. La présence d'acide sialique en position terminale des branches du N-glycane entraîne une diminution de la CDC et, partant, influe sur l'effet anti-inflammatoire de l'anticorps.

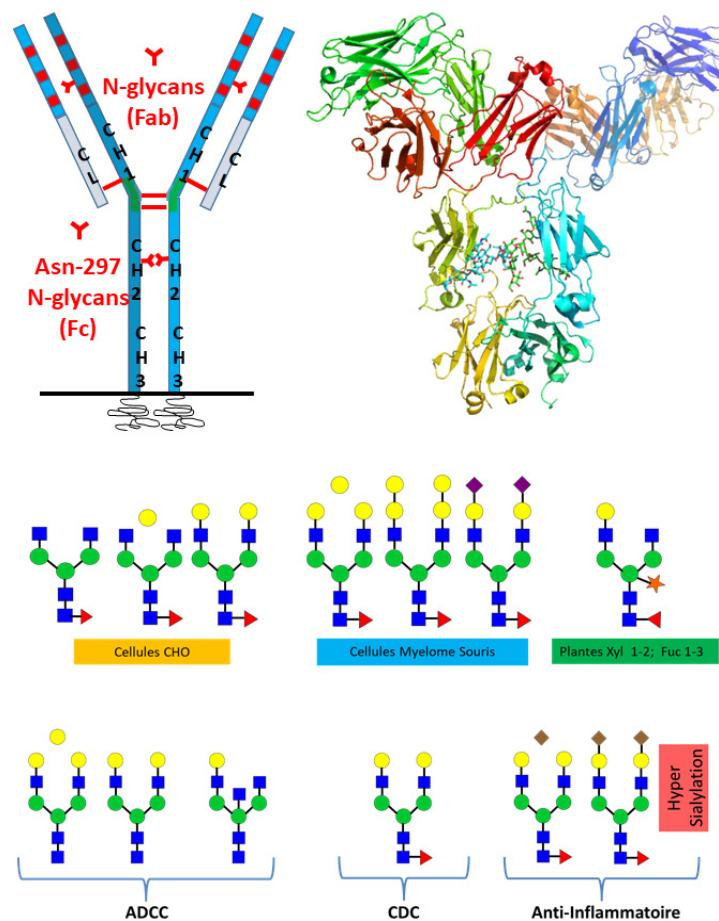


Figure 7. Glyco-Ingénierie des anticorps IgG pour augmenter la durée de vie de molécules thérapeutiques.
[21a][21b].

A ce jour, près de 50 anticorps sont utilisés à des fins thérapeutiques avec succès. La majorité de ces anticorps recombinants possèdent une glycosylation tronquée, ce qui affecte leur immunogénicité et leur efficacité (clairance rapide). L'optimisation de la glycosylation des anticorps thérapeutiques constitue donc une voie importante de recherche et des approches d'ingénierie génétique cellulaire sont mises en œuvre.

4. Les glycosaminoglycans

Longtemps désignés sous le terme de « mucopolysaccharides », les glycosaminoglycans (GAGs) conjuguent à la fois des propriétés résultant de leur nature polymérique (5 à 150 unités disaccharides par chaîne de GAG) en particulier une forte capacité de rétention d'eau) et des activités biologiques générées par la présence des constituants glycaniques et de leur caractère acide provenant de groupements sulfates. Tous les GAGs, à l'exception de l'acide hyaluronique, sont fixés de manière covalente sur des protéines. Ils constituent avec des protéines, un réseau tridimensionnel qui confère aux tissus et aux cellules un rôle structural et fonctionnel capable de moduler la prolifération, la migration et la différentiation.

Les propriétés structurales et fonctionnelles de la matrice extracellulaire résultent d'interactions spatio-temporelles qui mettent en jeu un ensemble complexe d'interactions protéines-protéines et protéines-GAGs, dont la dynamique est gérée par les conditions physiologiques et pathologiques.

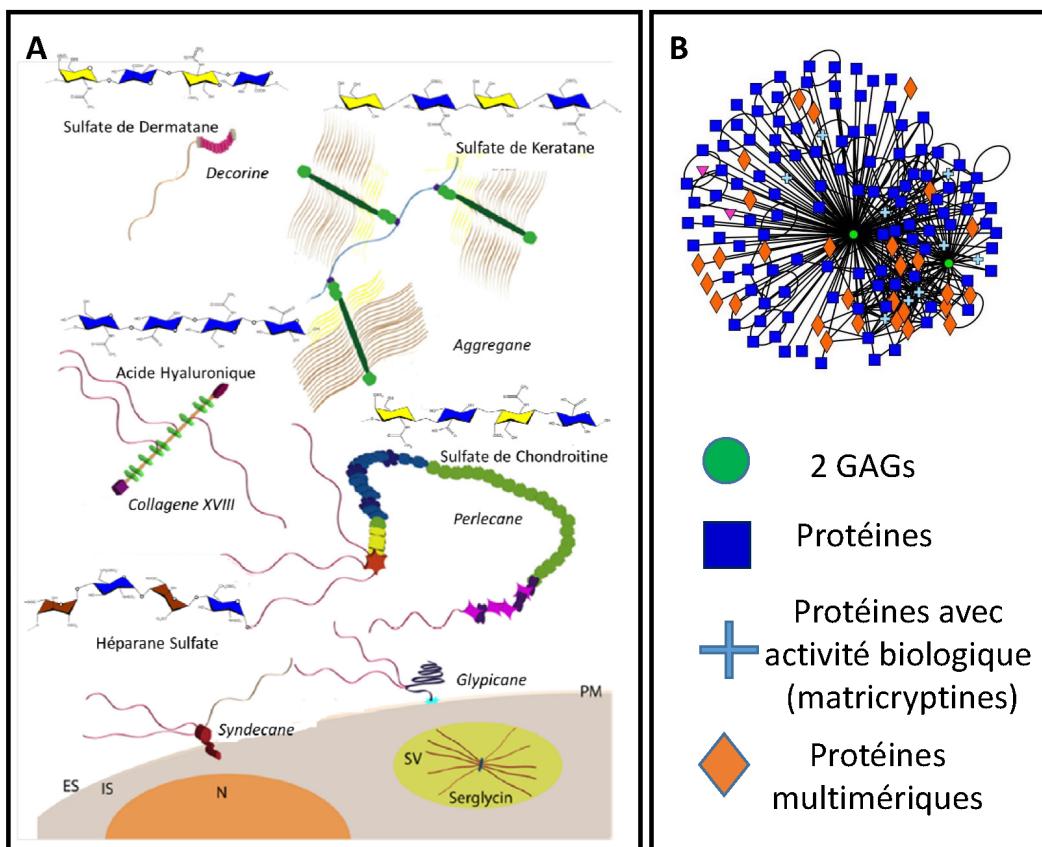


Figure 8. (A) GAGs dans leur environnement péricellulaires et matrice extracellulaire (Adapté de la référence [22]) (ES:extracellulaire ; IS : intracellulaire ; N : nucleus ; PM : plasma membrane ; SV : Secretory Vesicle) (B) Réseau d'interactions protéine-héparine/héparane sulfate construit à partir des données de la base d'interactions MatrixDB [23].

Les développements des outils de glyco-bio-informatique et l'enrichissement continu des bases de données fonctionnelles ont conduit à la création d'une base de données d'interactions extracellulaires

protéine-protéine et protéine-glycosaminoglycans. MatrixDB [26]. MatrixDB (<http://matrixdb.univ-lyon1.fr/>) est une base de données dans laquelle sont stockées des données sur les interactions biomoléculaires identifiées expérimentalement et impliquant au moins un constituant de la matrice extracellulaire. Ce sont des interactions protéine-protéine et des interactions protéine-glycosaminoglycane. Les données sont extraites manuellement de la littérature scientifique. MatrixDB inclut un navigateur (iNavigator) qui permet de construire des réseaux d'interactions spécifiques d'une ou plusieurs molécules (protéines ou glycosaminoglycans), d'un processus biologique ou d'une pathologie par exemple. MatrixDB contient également des données transcriptomiques et protéomiques quantitatives qui permettent de construire des réseaux spécifiques d'un tissu, d'un processus biologique ou d'une pathologie. Les réseaux d'interactions peuvent être exportés sous forme d'image ou sous un format compatible avec des outils bioinformatiques d'analyse topologique et fonctionnelle (<http://www.cytoscape.org/>).

Chez les mammifères on trouve six types de GAGS auxquels sont associées de nombreuses utilisations dans les domaines de la médecine, la chirurgie plastique, la cosmétique et la nutrition.

L'acide hyaluronique (HA) est le seul GAG à ne pas être sulfaté. Il se caractérise par une taille élevée (plusieurs milliers d'unités saccharidiques soit plusieurs millions de daltons ou MDa), ce qui lui confère des propriétés viscoélastiques et de solvatation exceptionnelles (il peut retenir jusqu'à 1000 fois son poids en eau). Il est présent dans de nombreux tissus conjonctifs (peau, humeur vitrée, liquide synovial) où il joue un rôle dans la plasticité tissulaire. Les injections d'acide hyaluronique et ses dérivés sont utilisées comme agents de visco-supplémentation dans l'arthrose du genou ou celle de la hanche.

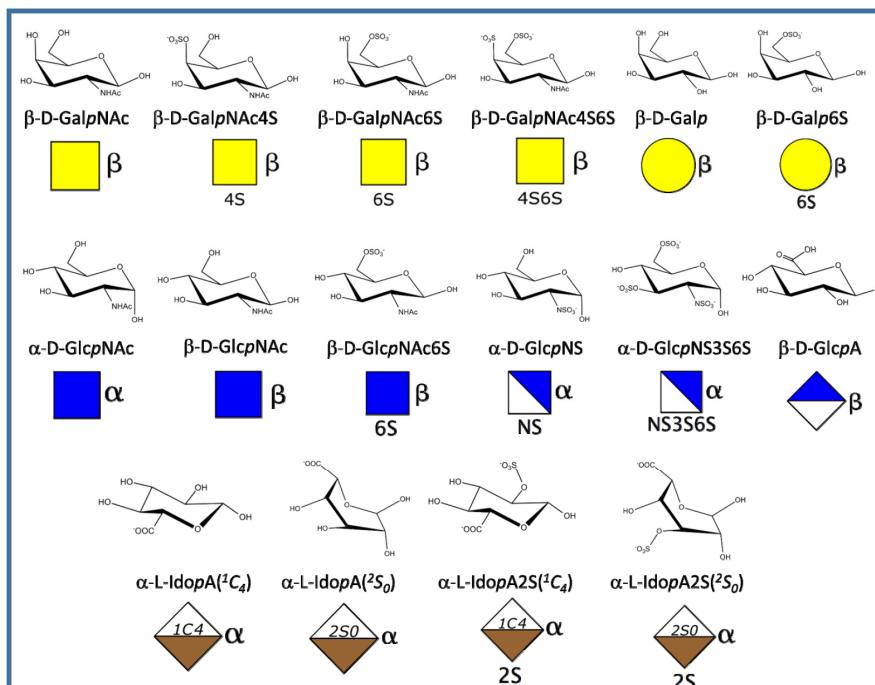


Figure 9. Représentations schématiques des motifs saccharidiques constitutifs des structures de glycosaminoglycans (GAG) liés à des protéines. A la représentation chimique est associée une représentation graphique qui décrit la nature du monosaccharide (couleur), ses substituants (forme) et modifications chimiques. La représentation SNFG [1] a été étendue afin d'incorporer les informations liées aux conformations que peuvent adopter certains monosaccharides tels que les Idoses [24].

A la différence de l'acide hyaluronique, les autres GAGs (héparine/héparane sulfate (HS), chondroitine sulfate, kératane sulfate, dermatane sulfates) sont sulfatés. Ces polymères sont formés, comme l'acide hyaluronique, d'un disaccharide de répétition de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) ou

N-acétyl galactosamine (GalpNAc) et d'acide glucuronique (GlcA) ou Iduronique (IdoA). Cependant, outre l'agencement différent des liaisons osidiques, ils s'en distinguent par de nombreuses sulfatations qui jouent un rôle dans ses propriétés biologiques et physico-chimiques. La combinaison des sulfatations en différentes positions, constitue un « glycocode » qui est décrypté par les protéines liées au GAGs.

La diversité structurale qu'engendre la sulfatation contribue à la richesse d'interactions avec un grand nombre de facteurs biologiques qui régulent les grandes fonctions cellulaires telles la différentiation, l'angiogénèse et la relation hôte-pathogène. Par exemple, l'héparine active une protéine plasmatique (antithrombine III) et possède des propriétés anticoagulantes puissantes. Son administration par voie sous-cutanée ou intraveineuse permet de prévenir ou traiter des thromboses. La dépolymérisation de l'héparine par voie chimique ou enzymatique conduit à des héparines de bas poids moléculaire qui s'administrent par injection sous-cutanée. Parmi les propriétés des HS, l'activité anti-thrombique est la plus connue pour être exploitée en médecine. L'identification du fragment responsable de l'activité biologique de l'héparine a permis la synthèse chimique d'un pentasaccharide (le fondaparinux) qui limite les accidents induits par l'héparine naturelle tels que la thrombopénie [25].

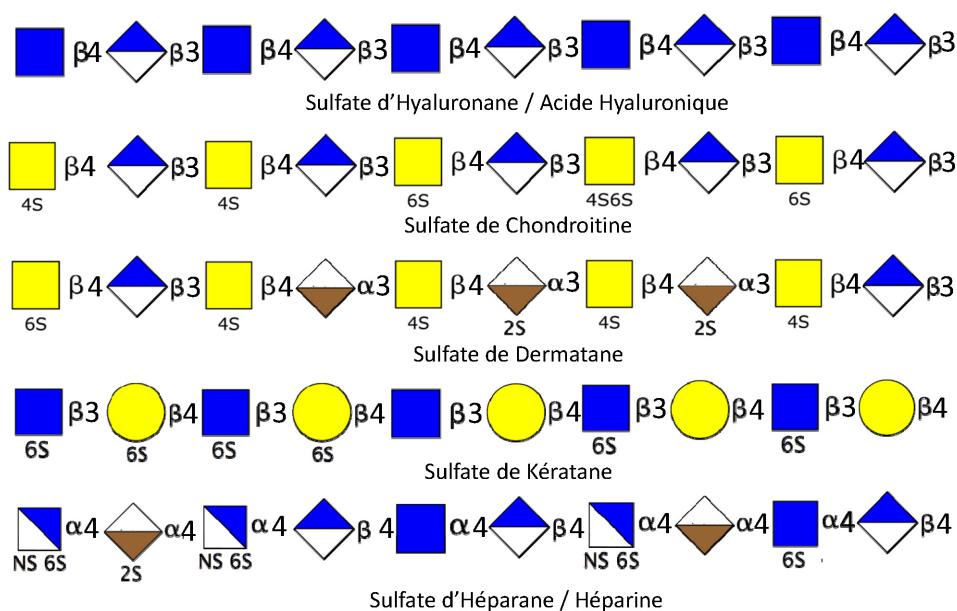


Figure 10. Représentation schématique de la composition structurale des Glycosaminoglycans illustrant la variété des motifs structuraux pouvant être présents au sein d'un même polysaccharide. L'enchaînement de ces motifs peut être irrégulier.

Si les utilisations des GAGs dans de nombreux domaines sont reconnues, se posent la question des sources d'où ils sont extraits et purifiés. Composants ubiquitaires de la peau, tendons, muscles et cartilages, les GAGs sont extraits de carcasses, abats et autres restes d'animaux en provenance d'abattoirs et de poissonneries, essentiellement du Sud Est Asiatique. Au mois de mars 2008, l'agence américaine Food and Drug Administration a annoncé d'importants rappels d'héparine en raison de contamination du stock brut d'héparine importé de Chine.

Plusieurs approches ont été développées afin d'éviter l'utilisation de ces sources pouvant contenir des agents transmissibles non conventionnels et des virus. Parmi elles, mentionnons le développement de procédés biotechnologiques de production de glycosaminoglycans ou la recherche de structure bio-similaires parmi la famille des exo-polysaccharides bactériens.

4. Production microbiologique

Traditionnellement extrait des crêtes de coq, l'acide hyaluronique est maintenant produit par des cultures bactériennes. En effet, et comme pour les structures oligosaccharidiques de surface cellulaire, l'acide hyaluronique est un constituant pariétal de certaines bactéries pathogènes où il participe au processus d'infection et à la formation du biofilm.

Les bactéries *Streptococcus equi* et *Pasteurella multocida* sont cultivées au niveau industriel pour fournir un acide hyaluronique dit « synthétique ». En dehors de l'exploitation industrielle de bactéries naturellement productrices d'acide hyaluronique, apparaît aujourd'hui l'utilisation de souches recombinantes. Cette méthode est rendue possible par la connaissance des voies de biosynthèse de l'acide hyaluronique ce qui a conduit au clonage des enzymes de biosynthèse dans des bactéries non pathogènes.

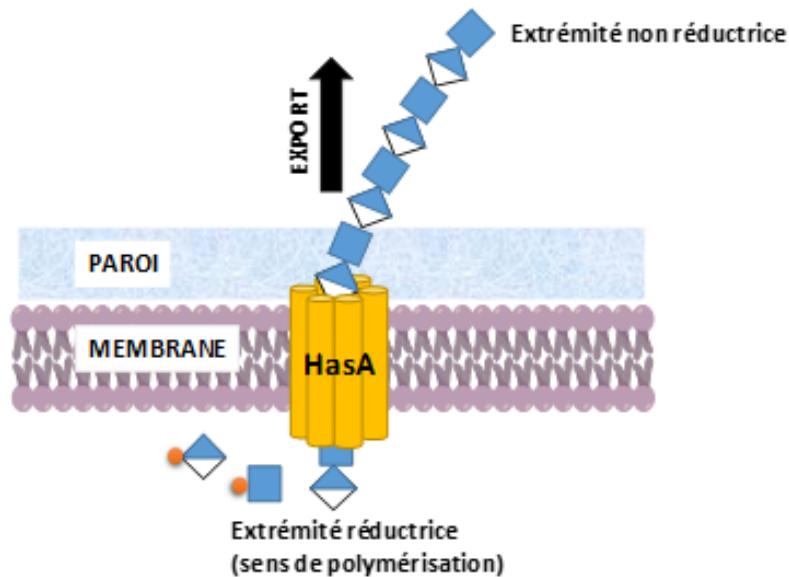


Figure 11. Synthèse de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus equi*. L'enzyme HasA est formée de six domaines transmembranaires impliqués dans la polymérisation et l'exportation de l'acide hyaluronique.

Pour exemple, la société Novozymes commercialise un acide hyaluronique (Hyasis®) issu d'une souche de *Bacillus subtilis* exprimant les enzymes de biosynthèse de *Streptococcus equi*, dont la HA synthase HasA. Cette enzyme remarquable possède une topologie transmembranaire et contrôle à la fois la synthèse et l'export du polysaccharide en formation. L'élongation s'effectue du côté de l'extrémité réductrice, de sorte que celle-ci puisse se faire de façon coordonnée à l'export (figure 11).

4.2. La voie des exo-polysaccharides bactériens

De nombreux micro-organismes Gram+ comme Gram- synthétisent des polysaccharides de compositions et de structures très variées, les exo-polysaccharides. Si leur exploitation industrielle est encore limitée et ne concerne que le xanthane, le gellane ou l'acide hyaluronique, la production d'autres polysaccharides à haute valeur ajoutée pourrait voir le jour. Les exo-polysaccharides bactériens sont une source de structures, en cours d'exploration, pour obtenir des analogues de GAGs d'origine non-animale. C'est par exemple le cas de la souche d'*Escherichia coli*, K5, qui produit un précurseur d'héparine non-sulfaté, donc inactif. D'une manière générale, les exo-polysaccharides sont rarement sulfatés ou faiblement sulfatés : ils vont donc constituer une nouvelle classe de macromolécules dites « GAG-mimétiques », pour lesquelles sera requise l'addition de groupement sulfate sur le squelette osidique. Si les procédés de sulfatation actuels utilisent des méthodes chimiques, il est néanmoins possible d'utiliser des enzymes de type sulfo-transférases, suivant la voie de l'ingénierie génétique bactérienne.

Ces principes de bio-ingénierie ont été mis en œuvre, et ont conduit à l'obtention d'héparine (neo-heparine) proprement sulfatée possédant des propriétés anti-coagulantes [26]

Il existe d'autres voies de recherches, pour de nouvelles sources de polysaccharides anioniques, plus sulfatés ou carboxylés, présentant des activités biologiques et dont le mimétisme avec les GAGs pourrait être exploité. Ceci passe par l'exploration de la biomasse présente chez les végétaux terrestre et dans les milieux marins en particulier les algues. Extraits d'algues brunes, les alginates et les fucanes font l'objet d'études pour leurs activités anticoagulante et antithrombotique, et leurs applications en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire.

5. Glycane et vaccinologie

C'est à Louis Pasteur que l'on doit, dès 1881 [27], la première mention de la capsule du pneumocoque majeur responsable de la pneumonie chez l'homme. Heidelberger et Avery établissent en 1923, la nature polysaccharidique de l'antigène [28]. L'identification de la nature polysaccharidique de cette capsule conduit en 1946 à la commercialisation du premier vaccin polysaccharidiques contre les pneumonies à pneumocoques, dont l'utilisation fût écourtée par la découverte et l'utilisation de la pénicilline.

La composition des polysaccharides capsulaires est spécifique de la bactérie qui les porte; on parle alors de sérogroupe ou de sérotype. Tous ces polysaccharides possèdent une masse moléculaire élevée. S'ils protègent la bactérie contre la réponse immunitaire innée de l'hôte infecté, ils n'en constituent pas moins des cibles majeures de la réponse immunitaire protectrice de ce dernier.

Plusieurs vaccins polysaccharidiques, composés de polysaccharides purifiés à partir de cultures bactériennes ont été développés et mis sur le marché. Ces vaccins polysaccharidiques de première génération, qui n'induisent pas ou peu d'effets secondaires, sont par contre inefficaces chez les jeunes enfants pour qui la demande de vaccination est la plus forte mais pour lesquelles la réponse immunitaire contre les antigènes T indépendants n'est pas encore acquise. La conversion de polysaccharides en antigène T indépendants s'effectue en greffant les polysaccharides sur une protéine porteuse. Ces vaccins sont, cette fois, efficaces chez les nourrissons et les enfants en bas âge.

Le premier vaccin de cette deuxième génération, totalement synthétique, a été développé et administré avec succès contre les méningites à *Haemophilus influenzae b.* [29]. Une réduction du nombre d'infections de l'ordre de 95% à 100% a été observée dans les pays où son administration a été systématique. La gravité des infections à *Haemophilus influenzae de type b* (Hib) a justifié la recherche d'un vaccin efficace, dont le support est le constituant polysaccharidique de la capsule du type b. La virulence de cette bactérie est liée au polyribosyl-ribitol-phosphate (PRP) capsulaire. Or, les anticorps spécifiques dirigés contre ces polysaccharides sont bactéricides et protecteurs. En conjuguant le vaccin PRP à des protéines, on obtient une réponse immunitaire thymo-dépendante et un meilleur pouvoir immunogène dès les premiers mois de la vie. Actuellement, seuls les vaccins conjugués à l'anatoxine téstanique sont utilisés en France. Ils se présentent sous forme isolée (Act-Hib®) ou associée dans les vaccins pentavalents acellulaires Infanrix Quinta® et Pentavac® et dans le vaccin hexavalent acellulaire Infanrix Hexa®.

Le méningocoque *Neisseria meningitidis* est responsable de près de la moitié des méningites bactériennes de l'enfant de 0 à 18 ans. Les infections à méningocoque restent une cause importante de morbidité et mortalité. Le méningocoque possède une capsule poly-oxidique qui détermine son séro-groupe. Parmi les douze séro-groupes décrits, les séro-groupes A, B, C, Y et W135 sont les plus répandus dans les infections invasives à méningocoque (IIM). On dispose en France de plusieurs types de vaccins : – les vaccins méningococciques non conjugués (bivalent A + C et tétravalent A, C, Y, W135); – les vaccins méningococciques conjugués (C et tétravalent A, C, Y, W135). Il n'existe pas actuellement de vaccin contre le méningocoque B disposant d'une autorisation de mise sur le marché.

La fièvre typhoïde est une septicémie à point de départ digestif liée à des salmonelles dites majeures: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi* A et B. Seuls les vaccins contenant un polysaccharide capsulaire Vi sont disponibles en France: – le vaccin Typhim Vi®; – le vaccin Typherix®. Ils sont constitués d'un polysaccharide capsulaire comportant l'antigène Vi *Salmonella Typhi* de la souche TY2 de *Salmonella Typhi*. Chaque dose de vaccin (0,5 ml) contient 25 µg de polysaccharide. Un vaccin combiné, Tyavax®, est également disponible ; il associe 25 µg de polysaccharide capsulaire Vi de *Salmonella Typhi* et 160 unités antigéniques de virus de l'hépatite A, souche GBM (inactivée). Ce vaccin n'est utilisable que chez l'adulte de 16 ans et plus.

La virulence de *Streptococcus pneumoniae* est liée en grande partie à sa capsule de nature polysaccharidique. Les polysaccharides capsulaires du pneumocoque induisent chez la souris et chez l'Homme une réponse thymo-indépendante, c'est-à-dire que ces antigènes ne peuvent se fixer que sur les récepteurs des lymphocytes B matures pour induire une réponse anticorps. Le vaccin polysaccharidique Pneumo 23® contient 25 µg de polysaccharide purifié de vingt-trois sérotypes. Une autorisation de mise sur le marché (AMM) a été délivrée au vaccin Prevenar 13®, vaccin pneumococcique 13-valent qui contient 2,2 µg de polyoside pneumococcique conjugué à la protéine vectrice CRM197 des sérogroupes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F et 23F, et 4,4 µg de polysaccharide du sérogroupue 6B.

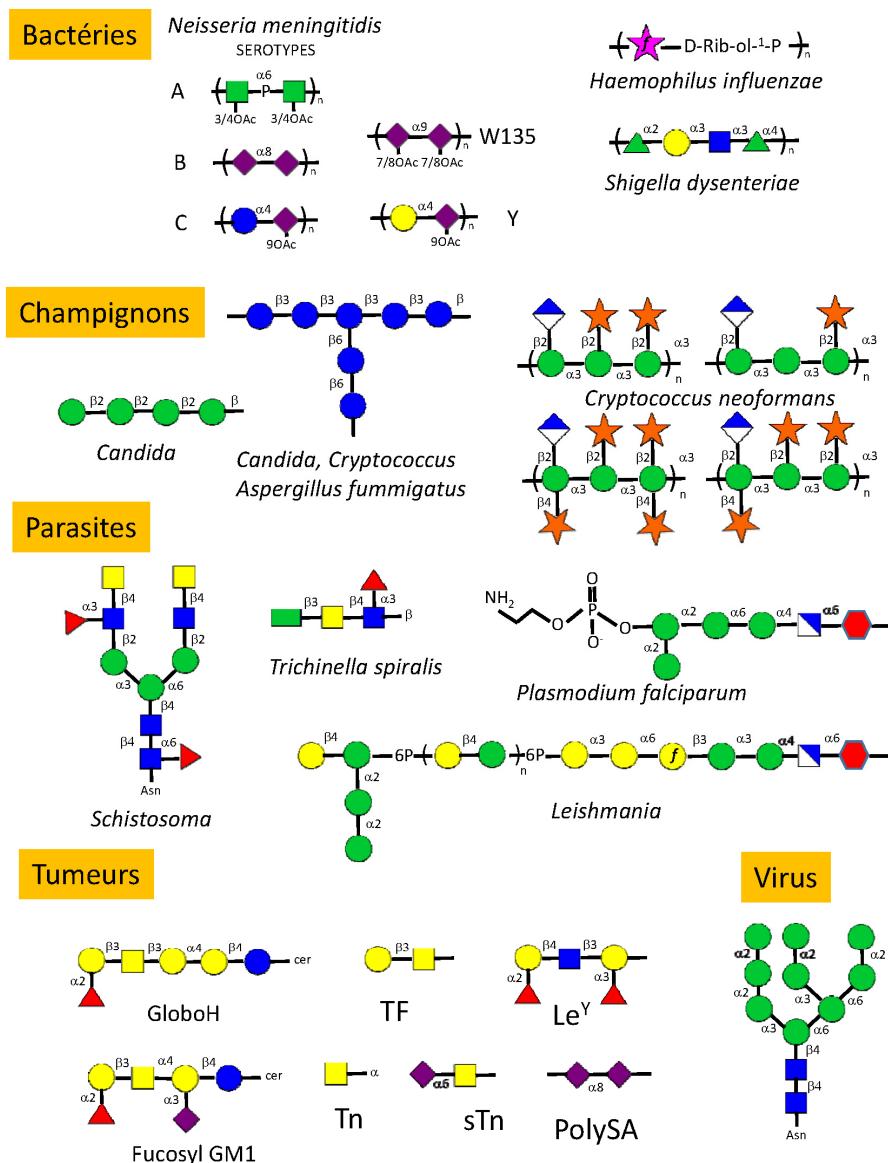


Figure 12. Origines et structures de divers antigènes glycaniques offrant des possibilités de développements de nouveaux vaccins (adapté de la référence [30]).

Indications	Vaccins en cours de développement
Escherichia coli Enterohaemorrhagic	Antigène O d'Escherichia conjugué à une protéine
Group A Streptococcus spp	Polysaccharide du groupe A conjugué à la toxine du tétanos
Group B Streptococcus spp	Polysaccharides de type Ia, Ib, II, III and V conjugués à une protéine porteuse
Haemophilus influenzae	Conjugué de sous unités détoxifiées du lipooligosaccharide
Haemophilus influenzae	Glycoconjugé octavalent O-polysaccharide avec la toxine A
Salmonella typhi	Conjugué d'exotoxine recombinante de <i>P. aeruginosa</i>
Shigella dysenteriae	Antigène O de Shigella conjugué à une protéine
Shigella flexneri	Antigène O de Shigella conjugué à une protéine
Streptococcus pneumoniae	Glycoconjugés de motifs synthétiques de polysaccharide
Vibrio cholerae	Partie polysaccharidique du Lipopolysaccharide conjuguée à une protéine
Aspergillus fumigatus	Conjugué de β -Glucane et d'un mutant inactivé de la toxine du tétanos
Candida albicans	Epitope d'oligomannoses conjugué à diverses protéines Conjugué de β -Glucane et d'un mutant inactivé de la toxine du tétanos.
Cryptococcus neoformans	Glycoconjugé du polysaccharide capsulaire avec la toxine du tétanos Conjugué de β -Glucane et d'un mutant inactivé de la toxine du tétanos.
Leishmania spp	Lipophosphoglycane Conjugés de Lipophosphoglycane
Plasmodium falciparum	Conjugué de Glycosylphosphotidylinositol
VIH-1	Epitope d'oligomannoses de Man $\alpha(1 \rightarrow 2)$ Man (conjugué à diverses souches de levures et de glycoprotéines modifiées)
Cancer du sein	Conjugés hexavalents (Globo H-GM2-Lewis γ -sTn-TF-Tn-R) sTn(c)-KLH adjuvant
Cancer de la Prostate	Conjugés hexavalents (Globo H-GM2-Lewis γ -sTn-TF-Tn-R) TF(c)- hemocyanine de la patelle comme adjuvant Tn(c)-KLH et Tn(c)-acide palmitique Globo H-Gm2-Lewis γ -MUC1-32(aa)-TF(c)-Tn(c)-hemocyanine de la patelle comme adjuvant

Tableau 2. Vaccins à base de glycoconjugés en phase de développement.

La mise au point délicate ainsi que le coût élevé de ces vaccins, dits de deuxième génération, contraignent le déploiement des campagnes de vaccination. A ces difficultés s'ajoutent celles qui résultent du comportement de certaines bactéries qui se protègent en exprimant des polysaccharides qui mimant les antigènes de l'hôte, empêchent leur reconnaissance par le système immunitaire de ce dernier. Il existe également de nombreuses bactéries dans lesquelles la capsule polysaccharidique est remplacée par une autre couverture sucre de type lipopolysaccharide qui, présentant une forte toxicité, ne peut être utilisée sous sa forme naturelle. C'est le cas de bactéries responsables d'infections

entériques (*Vibrio cholera*) ou de dysenteries bacillaires (*Shigella flexneri* et *S. dysenteriae*) qui elles sont pathogènes.

Plusieurs stratégies vaccinales sont donc envisagées. L'une d'entre elles, en cours de développement, vise à coupler le polysaccharide impliqué pour le rendre immunogène et éliminer ou contourner la toxicité intrinsèque des lipopolysaccharides et plusieurs études cliniques sont en cours. Dans tous les cas, il convient de prendre en compte la capacité des bactéries à sélectionner de nouveaux sérotypes contre lesquels les vaccins utilisés sont sans effet. Des travaux sont en cours qui concernent le développement de vaccins, qui utilisent des oligosaccharides de synthèse, contre les infections nosocomiales (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Bacillus anthracis*) ou contre les parasites [31].

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules saines par l'expression, à leur surface, de glycolipides ou de glycoprotéines qui portent des oligosaccharides de courte taille, désignés sous le terme de marqueurs tumoraux. [32]. Ces oligosaccharides qui résultent d'une altération de la glycosylation au sein de la cellule se comportent comme antigènes du soi et sont à ce titre tolérés par l'hôte porteur de la tumeur. La vaccination anti-cancer a pour objectif de briser cette tolérance. Les développements réalisés dans le domaine bactérien, sont mis à profit en greffant les oligosaccharides impliqués sur un peptide ou une protéine porteuse, afin d'engendrer les premiers vaccins anti-cancer [33].

6. Conclusions

Au-delà des développements et des applications présentés dans cet article il convient de mentionner que les glycans trouvent des utilisations dans le domaine des dispositifs médicaux implantables, actifs ou non. Ces réalisations résultent de l'association de la biotechnologie à la science des matériaux polymères et à la science de la matière molle. Des matériaux polysaccharidiques issus de la biomasse, tels que la cellulose ou la chitine, se prêtent à des modifications chimiques, enzymatiques, ou physico-chimiques. La chitine et sa forme déacétylée, le chitosane, sont des polymères qui sont généralement bien supportés par les tissus biologiques. A ce titre ils peuvent être utilisés comme support pour le renouvellement cellulaire. Des applications existent par exemple en tant que pansements ou peau artificielle pour le traitement de grands brûlés, mais également en ingénierie tissulaire. Des modifications contrôlées de cellulose permettent d'obtenir des substrats possédant des propriétés de résorption dans l'organisme humain à des fins d'utilisation en tant qu'implants chirurgicaux.

En conclusion, il apparaît clairement que le potentiel d'applications des glycans dans le domaine de la santé est important.

La complexité de ces structures macromoléculaires ainsi que les retards avec lesquels a été reconnue la richesse qu'offrent ces molécules expliquent le nombre limités d'applications cliniques. Toutefois, ces retards se combinent et tant les progrès en science analytique que l'émergence des voies biotechnologiques sont susceptibles de conduire à l'identification puis à la production de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique au sens large.

7. Remerciements

Les auteurs remercient les évaluateurs de cet article pour la pertinence de leurs commentaires et attestent du soutien de l'Action « Investissement d'Avenir (ANR-15-IDEX-02) au travers du Programme Transdisciplinaire « Glyco@Alps ».

Bibliographie

- [1] A.Varki , R.D. Cummings, M. Aebi, N.H. Packer, P.H. Seeberger, J.D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J.J. Prestegard, R.L. Schnaar, H.H. Freeze, J.D. Marth, C.R. Bertozzi, M.E. Etzler, M. Frank, F.G. Vliegenthart, T. Lütteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K.F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi & S. Kornfeld S, *Glycobiology* 2015, 25, 1323-1324.
- [2] O.J. Plante, E.R. Palmacci, P.H. Seeberger, *Science* 2011, 291, 152-1527.
- [3] P.H. Seeberger, *Accounts. Chem. Res.* 2015, 48, 1450-1463.
- [4] P.H. Seeberger, *Perspective in Science* 2017, 11, 11-17.
- [5] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R.A. Geremia R.A., *Carbohydr Res.* 1997, 302, 35-42.
- [6] B. Priem, M. Gilbert, W.W. Wakarchuk, A. Heyraud, E. Samain, *Glycobiology* 2002, 12, 235-40.
- [7] S. Drouillard, H. Driguez, E. Samain, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 45, 1778-80.
- [8] C. Dumon, C. Bosso, J.P. Utile, A. Heyraud, E. Samain, *ChemBioChem* 2006, 7, 359-365
- [9] T. Antoine, C. Bosso, A. Heyraud, E. Samain, *Biochimie* 2005, 87, 197-203.
- [10] S. Drouillard, T. Mine, H. Kajiwara, T. Yamamoto, E. Samain, *Carbohydr Res.* 2010, 345, 10, 1394-1399.
- [11] E.Richard, L. Buon, S. Drouillard, S. Fort, B. Priem. *Glycobiology* 2016, 26, 723-731.
- [12] R. Roy, E. Katzenellenbogen, H.J. Jennings. *Can J Biochem Cell Biol.* 1984, 62, 270-275.
- [13] J.C. Gildersleeve, O. Oyelaran, J.T. Simpson, B. Allred. *Bioconjug Chem.* 2008, 19,1485-90.
- [14] C.W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057-3064.
- [15] H.C. Kolb, M.G Finn, K.B. Sharpless. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001, 40, 2004-2021.
- [16] S. Fort, L. Birikaki, M.P. Dubois, T. Antoine, E. Samain, H. Driguez. *Chem Commun* 2005, 28, 2558-2260.
- [17] A. Petrelli, E. Samain, S. Pradeau, S. Halila, S. Fort. *Chembiochem.* 2017,18, 206-212.
- [18] M.C. Galan, P. Dumy, O. Renaudet. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 4599-4612.
- [19] M. Reynolds, M. Marradi, A. Imbert, S. Penades, S. Perez. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 4264-4273.
- [20] M. Reynolds, S. Perez. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 2011, 14, 74-95.
- [21a] A.M. Sinclair, S. Elliott. *J. Pharmaceutical Sci.* 2005, 95, 1026-1035
- [21b] A. Beck, J.A. Reichert. *Landes bioscience* (2012) <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.20996>
- [22] K. Rodgers, J.D. San Antonio, O. Jacenko. *Dev Dyn.* 2008, 237, 2622-2642.
- [23] G. Launay, R. Salza, D. Multedo, N. Thierry-Mieg, S. Ricard-Blum. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (Database issue):D321-7 (<http://matrixdb.univ-lyon1.fr/>)
- [24] S. Perez, K.F. Aoki-Kinoshita (2017) in “A Practical Guide to Using Glycomics DataBases”, Aoki-Kinoshita KF; Eds. Springer Nature, Springer Japan KK, Tokyo. Pp. 7-25
- [25] M. Petitou, P. Duchaussoy, J.M. Herbert, et al. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28, 393-402
- [26] J. Chen, F.Y. Avci, E.M. Munoz, L.M. McDowell, M. Chen, L.C. Pedersen, L. Zhang, R.J. Linhardt, J. Liu. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 42817-42825.
- [27] Pasteur L., Chamberland C., Roux E. *C. R. Acad. Sci.* 1881, 92, 1378–1383.
- [28] Heidelberger, M., Avery, O. T. *J. Exp. Med.* 1923, 38, 73–79.
- [29] V. Verez-Bencomo , V. Fernández-Santana , E. Hardy, M.E. Toledo, M.C. Rodríguez, L. Heynngnezz, A. Rodriguez, A. Baly, L. Herrera, M. Izquierdo, A. Villar, Y. Valdés, K. Cosme, M.L. Deler, M. Montane, E. Garcia, A. Ramos, A. Aguilar, E. Medina, G. Toraño, I. Sosa, I. Hernandez, R. Martínez, A. Muzachio, A. Carmenates, L. Costa, F. Cardoso, C. Campa, M. Diaz, R. Roy. *Science* 2004, 305, 522–525.
- [30] R. Astronomo, D.R. Burton. *Nature Reviews* 2010, 9, 309-324.
- [31] Nyame, A. K., Kawar, Z. S. & Cummings, R. D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 426, 182–200.
- [32] Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H. & Robbins, P. W. *Biochemistry*, 1969, 8, 2518–2524. ss

Webographie

<http://www.imgt.org/IMGTeducation/IMGTlexique/G/Glycosylation.html>

MatrixDB <http://matrixdb.univ-lyon1.fr/>

Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

Glyco3D <http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/>

IMEX <http://www.imexconsortium.org/>

CYTOSCAPE <http://www.cytoscape.org/s>