50376
1979
144

N° d'ordre : 458

50376
1979
144

89 847
ppn 036110892

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

René CACAN

Maître-Assistant de Biochimie

RECHERCHES SUR LES ECTOGLYCOSYLTRANSFÉRASES : ETUDES DES GALACTOSYL-, SIALYL- ET FUCOSYLTRANSFÉRASES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DU LYMPHOCYTE SPLÉNIQUE DE RAT.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Présentée le 29 mai 1979, devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL (Rapporteur)
Rapporteurs :	P. MANDEL
	G. SPIK
Examinateurs :	M. LAZDUNSKI
	A. VERBERT

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur André VERBERT dans le laboratoire de Chimie Biologique (Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217).

Il a bénéficié d'une aide de l'I.N.S.E.R.M. (contrat de recherche libre n° 78-1-1942).

À MA FEMME

À LA MÉMOIRE DE MES PARENTS

À ODILE ET MYRIAM.

J'adresse également mes très sincères remerciements à

MONSIEUR BERNARD HOFLACK

Avec qui une partie de ce travail a été réalisée. Ta haute compétence technique et ta bonne humeur m'ont été infiniment précieuses.

MONSIEUR PHILIPPE DEBEIRE

Qui m'a apporté sa collaboration pour la préparation de la glycophorine et de ses dérivés.

MONSIEUR BERNARD FOURNET

Qui a effectué les analyses en chromatographie en phase gazeuse de la composition en sucres de nos accepteurs.

MONSIEUR STÉPHANE BOUQUELET

Qui nous a généreusement offert une préparation purifiée de CMP-NeuNAc hydrolase.

MONSIEUR BERNARD LASSALLE

A qui nous devons les contrôles en microscopie électronique de nos préparations de lymphocytes.

Je tiens à remercier particulièrement le PROFESSEUR NATHAN SHARON qui a dirigé nos premiers pas dans le domaine des lectines lors du stage que nous avons effectué dans son laboratoire au WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCES, REHOVOT (Israël).

À ANDRÉ,

La petite pierre que nous apportons à la connaissance de la Cellule est le résultat de l'Amitié que tu m'as accordée depuis mon entrée au Laboratoire et aussi de ta conception de la Biologie Moléculaire. Je souhaite que cette aventure dure encore de nombreuses années.

À MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN MONTREUIL

Vous m'avez conduit jusqu'à cette thèse, elle représente nos premiers pas dans un domaine de la Biochimie qui vous tient particulièrement à coeur : la Biologie Moléculaire des Glycoconjugués. Vous m'avez accordé votre confiance, je veux, aujourd'hui, vous en remercier.

À MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL MANDEL

Vous avez bien voulu juger cette thèse. Vos travaux sur les ectoenzymes des cellules nerveuses d'une part, et les discussions fructueuses de nos résultats, d'autre part, montrent l'intérêt que vous portez à ce sujet. Je ressens avec fierté l'honneur que vous me faites.

À MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL LAZDUNSKI

Vous me faites l'honneur de bien vouloir juger cette thèse, je vous en remercie vivement.

À MADEMOISELLE LE PROFESSEUR GENEVIÈVE SPIK

Par tes travaux sur les pyrophosphatases sériques, tu nous as sensibilisé au problème de la dégradation des glycosyl-nucléotides en nous faisant gagner un temps précieux. Je voudrais saisir l'occasion qui m'est offerte pour te remercier sincèrement.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

15 Septembre 1978

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	BACCHUS Pierre	Astronomie
M.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BIAYS Pierre	Géographie
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique
M.	DERCOURT Jean	Géologie Générale
M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

.../...

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

.../...

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUBRULLE Alain	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	PARSY Fernand	Mécanique
Mle	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M.	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie

.../...

Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. WALLART Francis	Chimie
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

INTRODUCTION..... p. 1

GENERALITES..... 5

BIOLOGIE MOLECULAIRE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE..... 5

I - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE..... 5
A - LES GLYCOLIPIDES..... 5
1 - Les glycolipides neutres..... 6
2 - Les gangliosides..... 8
3 - Variations de la composition en glycolipides.... 9
B - LES GLYCOPROTEINES..... 10
1 - Structures glycanniques déterminées avec des glycoprotéines membranaires isolées..... 12
2 - Structures glycanniques déterminées avec des glycopeptides membranaires..... 14
3 - Variations de la composition et de la structure des glycoprotéines membranaires..... 16
C - LES PROTEOGLYCANNES..... 17
1 - Structure des protéoglycannes membranaires..... 17
2 - Variation de la composition en protéoglycannes.. 19

II - LE ROLE DES GLYCOCONJUGUES DE LA SURFACE CELLULAIRE..... 19
A - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE DETERMINANTS ANTIGENIQUES..... 20
1 - Déterminants antigéniques portés par les glycolipides..... 20
2 - Déterminants antigéniques portés par les glycoprotéines..... 22
B - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE RECEPTEURS DE VIRUS..... 24
C - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE RECEPTEURS DE MOLECULES SOLUBLES..... 24
1 - Les récepteurs couplés à l'adényl-cyclase..... 25
a - Les récepteurs de toxines..... 25
b - Les récepteurs hormonaux..... 25
2 - Les récepteurs non couplés à l'adényl-cyclase... 27

D - ROLE DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES DANS L'ADHESION ET LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE..... p. 28
1 - Interaction glycanne-glycanne..... 29
2 - Interaction glycanne-récepteur..... 30
a - Le récepteur est une ectoglycosyltransférase 30
b - Le récepteur est une lectine..... 32
3 - Intervention d'un facteur d'agrégation..... 33
E - RÔLE ENZYMATIQUE DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES..... 33
F - ROLE DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES DANS LE CONTROLE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE..... 35
1 - Contrôle de la perméabilité aux cations..... 35
2 - Contrôle de la perméabilité aux anions et à l'eau..... 35
3 - Contrôle de la perméabilité aux drogues..... 35
G - ROLE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE DANS LE DECLENCHEMENT DE LA MITOSE..... 36
1 - Le ligand est un antigène..... 37
2 - Le ligand est une lectine..... 37
3 - Modifications chimiques des glycoconjugués de surface..... 38

LE METABOLISME DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE..... 39

I - LE RENOUVELLEMENT DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES..... 39
II - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE..... 40
1 - L'hypothèse du "membrane flow"..... 40
2 - La biosynthèse par les ectoglycosyltransférases. 42
III - LE CATABOLISME DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE..... 48

CONCLUSIONS..... 50

TRAVAUX PERSONNELS..... 54

I - LE CHOIX DE LA CELLULE ET DES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES..... 54
A - PROBLEME DU CHOIX DE LA CELLULE..... 54
B - PROBLEME DU CHOIX DES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES..... 55
II - ETUDE DE L'ECTOGALACTOSYLTRANSFERASE..... 57
A - ARTICLE I : Nouvelle preuve de l'existence d'une galactosyltransférase à la surface cellulaire..... 57

B - ARTICLE II : Ectogalactosyltransférase : présence d'enzyme et d'accepteurs à la surface du lymphocyte de Rat..... p. 64
III - ETUDE DE L'ECTOSIALYLTRANSFERASE..... 71
A - ARTICLE III : Propriétés particulières de l'ectosialyltransférase envers les accepteurs exogènes..... 71
B - ARTICLE IV : Mise en évidence d'un inhibiteur intracellulaire de l'ectosialyltransférase du lymphocyte.. 78
C - ARTICLE V : Détection de l'activité ectosialyltransférasique en utilisant des cellules entières : correction de l'erreur due à la libération de CMP-NeuNAc intracellulaire..... 84
IV - ETUDE DE L'ECTOFUCOSYLTRANSFERASE : ARTICLE VI : Mise en évidence de deux activités fucosyltransférasiques à la surface du lymphocyte de Rat..... 104
V - CONCLUSIONS GENERALES..... 111

APPENDICE TECHNIQUE..... 119

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE : LES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT 119
A - PREPARATION..... 119
B - COMPTAGE ET MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE..... 119
C - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE..... 119
II- PREPARATION DE LA GLYCOPHORINE ET DE SES GLYCOPEPTIDES.... 120
A - PREPARATION ET CONTROLE DE LA PURETE..... 120
B - PREPARATION DE L'ASIALOGLYCOPHORINE..... 122
C - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES..... 124
III - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS EXOGENES INSOLUBILISES..... 125
IV - PREPARATION ET MARQUAGE DE LA LECTINE DU SOJA (SBA)..... 127
A - ARTICLE VII : Marquage de l'agglutinine du Soja par oxydation au periodate de sodium suivie par une réduction grâce au ^{3}H borohydrure de sodium..... 127
B - ARTICLE VIII : Présence de deux types de sous-unités dans l'agglutinine du Soja..... 131

INTRODUCTION

D'abord considérée comme une frontière passive entre les milieux intra- et extracellulaire, la membrane plasmique est aujourd'hui le centre des recherches des Biologistes, Physiologistes, Biochimistes, Biophysiciens et Pathologistes. En plus de son rôle de barrière, c'est la relation de la cellule avec son environnement que contrôle la membrane.

Si la nature lipoprotéique de cette structure fut rapidement démontrée, il fallut attendre les premiers isolements de membranes plasmiques pour que s'impose l'idée d'un complexe glycolipoprotéique. Bien que les glucides de la surface cellulaire représentent une fraction mineure (souvent inférieure à 10 %) de la membrane, on leur attribue des rôles biologiques prépondérants : déterminants antigéniques, récepteurs de virus, récepteurs d'hormones, de toxines, rôle dans l'adhésion et la reconnaissance cellulaire, rôle enzymatique et de contrôle de la perméabilité membranaire. Leur implication dans le déclenchement de la mitose, bien qu'il soit mal compris, semble être le point essentiel de la Biologie Moléculaire des constituants membranaires comme le prouvent les modifications profondes que subissent les glycoconjugués de surface dans les processus de cancérisation.

Bien que l'étude structurale des glycoconjugués membranaires soit difficile, quelques structures de glycolipides et de glycoprotéines membranaires sont actuellement connues. Fondé sur cette étude structurale, le rapport entre structure et fonction des glycoconjugués membranaires commence à s'établir. Cette Biologie Moléculaire des glycoconjugués de surface a permis de dégager deux points importants :

1 - Les glycoconjugués sont intégrés dans une "mosaïque fluide", selon le concept de SINGER et NICOLSON (1), représentée dans la Figure 1. L'ancrage se fait grâce à des interactions hydrophobes à l'aide du céramide pour les glycolipides ou d'une fraction hydrophobe portée par les chaînes peptidiques pour les glycoprotéines.

2 - Les glycannes, dirigés vers le milieu extracellulaire, sont des signaux de reconnaissance et sont responsables du rôle biologique que jouent les glycoconjugués des surfaces cellulaires.

Alors qu'un schéma général semble se dégager de ces études le problème de la biosynthèse des fractions glycanniques ainsi que la manière dont elles sont réparées ou dégradées reste du domaine de l'hypothèse.

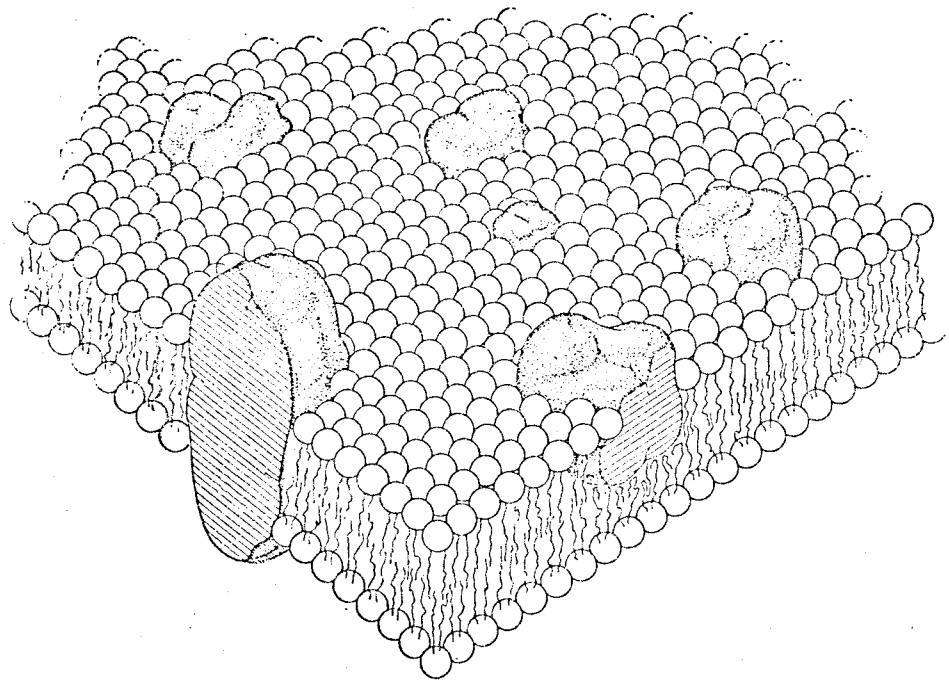


Figure 1 :

Schéma de la mosaïque fluide : modèle de membrane proposé par SINGER et NICOLSON.

Nous nous sommes attachés dans ce travail à examiner l'une de ces hypothèses dans le but de répondre aux questions suivantes : les glycoconjugués membranaires peuvent-ils être synthétisés ou réparés sur la membrane elle-même grâce à des ectoenzymes ? Existe-t'il des ectoglycosyltransférases, sont-elles fonctionnelles, comment sont-elles régulées ?

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous exposerons les principaux travaux portant sur la biologie moléculaire des glycoconjugués de surface et nous passerons en revue les hypothèses relatives à leur biosynthèse.

Nos recherches ont fait, jusqu'à présent, l'objet des publications suivantes :

1 - R. LOTAN, H. DEBRAY, M. CACAN, R. CACAN and N. SHARON : Labeling of soybean agglutinin by oxidation with sodium periodate followed by reduction with sodium [^{3}H] borohydride.
J. Biol. Chem. (1975) 250, 1955-1957.

2 - R. LOTAN, R. CACAN, M. CACAN, H. DEBRAY, W.G. CARTER and N. SHARON :
On the presence of two types of subunit in soybean agglutinin.
FEBS-Lett. (1975) 57, 100-103.

3 - R. CACAN, A. VERBERT and J. MONTREUIL :
New evidence for cell surface galactosyltransferase.
FEBS-Lett. (1976) 63, 102-106.

4 - A. VERBERT, R. CACAN and J. MONTREUIL :
Ectogalactosyltransferase. Presence of enzyme and acceptors on the rat lymphocyte cell surface.
Eur. J. Biochem. (1976) 70, 49-53.

5 - A. VERBERT, R. CACAN, Ph. DEBEIRE and J. MONTREUIL :
Peculiar behavior of ectosialyltransferase to ward exogenous acceptors.
FEBS-Lett. (1977) 74, 234-238.

6 - R. CACAN, A. VERBERT, B. HOFLACK and J. MONTREUIL :
Occurrence of an intracellular inhibitor of ectosialyltransferase in lymphocytes.
FEBS-Lett. (1977) 81, 53-56.

7 - B. HOFLACK, R. CACAN and A. VERBERT :
Occurrence of two fucosyltransferase activities at the outer surface of rat lymphocytes.
Eur. J. Biochem. (1978) 88, 1-6.

8 - B. HOFLACK, R. CACAN, J. MONTREUIL and A. VERBERT :
Detection of ectosialyltransferase activity using whole cells : correction of misleading results due to the release of intracellular CMP-N-acetyl-neuraminic acid.
Biochim. Biophys. Acta, sous presse.

Les communications suivantes ont été présentées :

1 - B. HOFLACK, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL :
Variation de l'activité ectogalactosyltransférasique lors de la transformation blastique du lymphocyte induite par la PHA.
Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique, Lyon, 7-9 Juillet 1977.

2 - A. VERBERT, R. CACAN, B. HOFLACK and J. MONTREUIL :
Comparative study of ectogalactosyl- and ectosialytransferases of lymphocytes.
Proceedings of the IVth International symposium on glycoconjugates. Woods Hole, U.S.A., 27 Sept.-1er Oct. 1977.

3 - A. VERBERT, R. CACAN, B. HOFLACK et J. MONTREUIL :
Etude comparée de l'accessibilité des sites actifs des ectogalactosyl- et ectosialyltransferases aux accepteurs exogènes et aux glycoconjugués des

surfaces cellulaires.
VIIèmes Journées sur la chimie et la biochimie des glucides, Pont-à-Mousson, 23-26 Octobre 1977.

4 - B. HOFLACK, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL :
Etude des activités ectofucosyltransférasiques du lymphocyte splénique de Rat. Comparaison aux activités des ectogalactosyl- et ectosialyltransférases.
VIIIèmes Journées sur la chimie et la biochimie des glucides, Chamerolles, 17-20 Décembre 1978.

Nous avons en outre collaboré à des travaux qui ne s'inscrivent pas directement dans le cadre de ce mémoire :

1 - A. VERBERT et R. CACAN :
Description d'un procédé électrophorétique de séparation de l'AMPcyclique de ses métabolites. Application à la détermination de l'action adénylcyclasique.
Biochimie (1972) 54, 1491-1492.

2 - Ph. DEBEIRE, B. HOFLACK, R. CACAN, A. VERBERT and J. MONTREUIL:
Effect of cyclic nucleotides in *in vitro* assays of rat liver galactosyltransferase.
Biochimie (1977) 59, 473-477.

GENERALITES

BIOLOGIE MOLECULAIRE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE

Les glycoconjugués de surface des cellules de Mammifères sont groupés en trois classes : les glycolipides, les glycoprotéines et les protéoglycannes. Ces composés sont présents dans toutes les membranes cellulaires, (nucléaires, mitochondriales et microsomales). Nous n'examinerons dans ce chapitre que les glycoconjugués de la membrane plasmique.

La membrane plasmique est asymétrique et cette asymétrie se retrouve particulièrement au niveau des glycoconjugués. Les glucides ne sont en effet détectables que sur la face externe des membranes. Les preuves cytologiques sont nombreuses. En effet la coloration des sialoglycoprotéines par l'hydroxyde de fer colloïdal (MARX *et al.* : 2 ; WEISS et SUBJECK : 3 ; KODAMA *et al.* : 4) ou la précipitation de grains d'argent après oxydation periodique (RAMBOURG et LEBLOND : 5) mettent en évidence le glycolemme. Celui-ci est révélé également par l'utilisation de lectines couplées à la ferritine notamment par l'équipe de NICOLSON (NICOLSON et SINGER : 6 ; HIRANO *et al.* : 7 NICOLSON et SINGER : 8), et plus récemment par l'emploi de marqueurs cytochimiques glycosylés et de lectines, technique mise au point par le groupe de Michel MONSIGNY (KIEDA *et al.* : 9 ; GROS *et al.* : 10).

La présence d'un glycolemme qui double la face externe de la membrane et dont la morphologie est bien décrite dans la revue générale de PARSONS et SUBJECK (11) a pu également être mise en évidence par des méthodes biochimiques. L'utilisation d'enzymes qui ne pénètrent pas dans la cellule, comme la galactose oxydase, permet de marquer les glycolipides et les glycoprotéines de surface en partant de cellules entières ou de vésicules membranaires possédant une orientation normale ou inversée (voir, par exemple, les travaux de GAHMBERG et HAKOMORI (12) et ceux de STECK et DAWSON (13).

La détermination de la structure de ces composés n'est possible qu'après l'isolement des molécules et n'a pu être réalisée qu'après la mise au point de méthodes fines d'exploration de la structure.

I - LA STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE

A - LES GLYCOLIPIDES

Les glycolipides à sphingosine ou glycosphingolipides restent les structures les mieux connues parmi les glycoconjugués membranaires. En effet, d'une part, ils ne possèdent qu'un seul glycanne par molécule ce qui en simplifie l'étude et d'autre part 80 à 90 % d'entre eux sont localisés dans la membrane plasmique (KLENK et CHOPPIN : 14 ; GAHMBERG : 15 ; KEENAN *et al.* : 16), ce qui permet de les étudier à partir de cellules totales

sans isolement préalable de la membrane.

La partie lipidique : la céramide, permet l'intégration de la molécule dans la membrane. Le glycanne possède le motif de base commun du lactose β-Gal-(1 → 4)- α-Glc-(1 →), le glucose se liant sur la céramide. A partir de cette lactosyl-céramide ou GL_2 se constituent des glycolipides de plus en plus complexes et dont les formules sont résumées dans le tableau I (p. 7). Nous distinguerons les glycolipides neutres des gangliosides, c'est-à-dire des glycolipides possédant de l'acide sialique.

1 - Les glycolipides neutres

Ils sont caractérisés par la présence de N-acétylosamines, la N-acétylgalactosamine ou la N-acétylglucosamine.

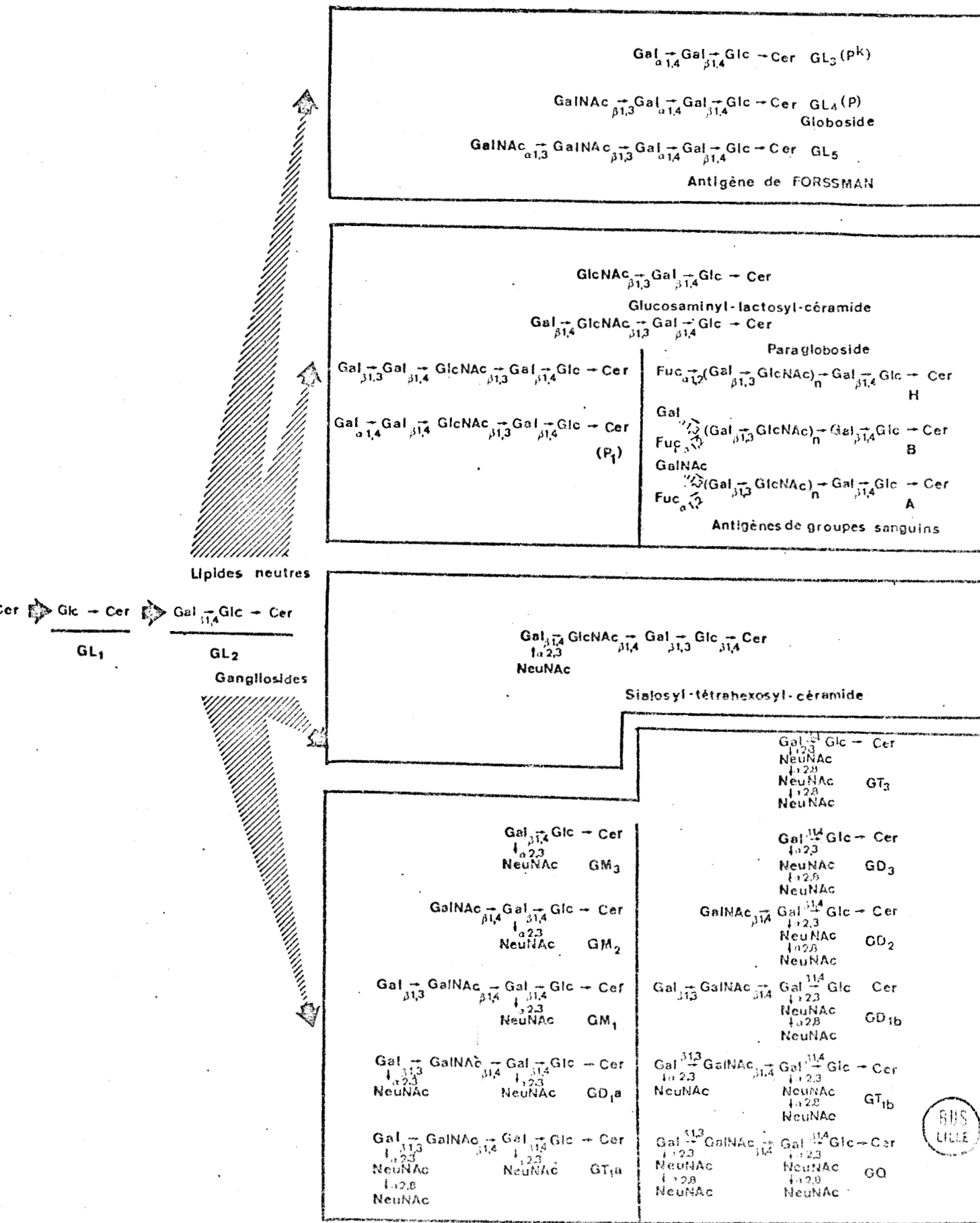
Les glycolipides neutres possédant de la N-acétylgalactosamine ont été d'abord isolés d'hématies humaines et de fibroblastes de Hamster. HAKOMORI *et al.* (17) ont démontré la structure du céramide trihexoside (Gl_3) et du globoside (Gl_4) puis de l'antigène de Forssman qui possède en plus du globoside un résidu α-N-acétylgalactosaminyl en position non réductrice (SIDDIQUI et HAKOMORI : 18).

La présence de glycolipides possédant de la N-acétylglucosamine est bien démontrée, et la structure du glucosaminyl-lactosyl-céramide a été étudiée par ANDO *et al.* (19)après son isolement de la membrane d'hématie humaine. A partir de la même source, l'isolement du "paragloboside" ou lacto-N-neotétraosylcéramide a permis de l'identifier à un antigène de surface de la tumeur de Hamster NILpy (SUNDSMO et HAKOMORI : 20). Ce glycolipide réagit avec un antisérum anti-pneumocoque XIV (SIDDIQUI et HAKOMORI :21). Deux céramyl pentasaccharides à N-acétylglucosamine ont été également isolés par STELLNER et HAKOMORI (22) et par NAIKI *et al.* (23). Ces derniers ont montré que la structure suivante : α-Gal-(1 → 4)- β-Gal-(1 → 4)- β-GlcNAc-(1 → 3)- β-Gal-(1 → 4)- α-Glc (1 →)-Cer correspondait à une activité de groupe P_1.

Le fucose a été souvent décelé dans les glycolipides. Le plus simple de tous est le α-L-fucosyl céramide qui s'accumule dans les tumeurs humaines du colon comme l'ont montré WATANABE *et al.*(24).Mais souvent les fucoglycolipides possèdent une activité de groupe sanguin A, B, H, LEWIS a et LEWIS b (HAKOMORI et JEANLOZ :25 ; HAKOMORI et STRYCHARD :26). La structure révèle outre la présence des déterminants A, B ou H, la présence de N-acétylglucosamine voir par exemple les travaux de KOŚCIELAK *et al.*(27). En fait une structure telle que Fuc (1 → 2)Gal (1 → 3)GalNAc (1 → 4) Gal (1 → 4) Glc-Cer ayant une activité de groupe H est un exemple de glycolipide

TABLEAU I

STRUCTURE DE QUELQUES GLYCOLIPIDES ISOLES DES MEMBRANES PLASMIQUES DE CELLULES DE MAMMIFERES



BUS LILLE

à activité de groupe sanguin possédant de la N-acétylgalactosamine ; cette molécule a été trouvée dans l'hépatome ascitique de Rat AH 7974 F (MATSUMOTO et TAKI :28). A côté de ces structures simples à glycanne peu important on isole actuellement des céramide-heptasaccharides (SLOMIANY et SLOMIANY :29) possédant des glycannes branchés et des mégaloglycolipides (GARDAS et KOSCIELAK 30 ; SLOMIANY et SLOMIANY : 31 ; GARDAS : 32) formés de 22 résidus saccharidiques comme le montre la figure 2 et portant une activité de groupe sanguin I (GARDAS : 34).

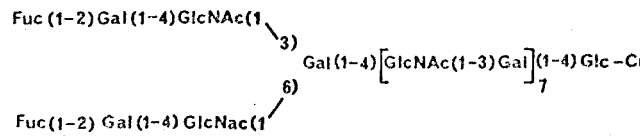


Figure 2 :
Structure proposée pour le mégaloglycolipide S_{22} par A. GARDAS (33).

2 - Les gangliosides

La présence d'acide sialique dans les glycosphingolipides a été démontrée il y a plus de 25 ans dans les globules rouges de Mammifères par YAMAKAWA et SUZUKI (35) et KLENK et WOLTER (36). Les gangliosides possèdent dans leur molécule outre de l'acide sialique, des N-acétylosamines. Le ganglioside majeur de l'hématie humaine ou sialosyl tétrahexosylcéramide possède de la N-acétylglucosamine (KOSCIELAK *et al.* :37 , ANDO *et al.* :38 , WHERRET :39).

Ces gangliosides à N-acétylglucosamine peuvent être distingués de ceux contenant de la N-acétylgalactosamine abondants dans le tissu nerveux. Ces derniers connus depuis plus longtemps ont été isolés pour la première fois par KLENK en 1935 (40). Ces gangliosides sont désignés suivant la nomenclature de SVENNERHOLM (41) par le nombre de résidus sialyl présents dans la molécule. On distingue ainsi les monosialogangliosides : GM1, 2 et 3, les disialogangliosides GD1a et 1b, GD2 et GD 3, les trisialogangliosides GT1a et 1b, GT3 et les tétrasialogangliosides GQ. Il faut remarquer la présence de groupements disialosyl (α-N-acétylneuraminyl (2 → 8) N-acétylneuraminyl) dans les gangliosides.

3 - Variations de la composition en glycolipides

Il faut noter que la nature des glycolipides ainsi que leur intégration dans la membrane varie fortement avec les conditions physiologiques cellulaires. Les variations les plus importantes se rencontrent dans le cas des cellules foetales, des cellules transformées et lors de modifications du taux de croissance.

La comparaison de la réactivité du globoside vis à vis d'un serum antigloboside dans les érythrocytes adultes et foetaux montre que ces derniers sont plus accessibles aux anticorps (HAKOMORI : 42) bien que les taux de ce glycolipide soient identiques dans les deux types cellulaires. La partie glycannique de la molécule semble être exposée dans les cellules foetales et cachée dans la membrane dans les cellules adultes.

La transformation cellulaire permet de montrer le même phénomène : par exemple, les glycolipides de type hématoside (ganglioside GM3) sont plus exposés dans les cellules BHK et 3T3 transformées par le virus du polyome:py BHK ou le SV40:SV40 3T3 que dans les cellules normales (HAKOMORI *et al.* 43). En plus de cette différence de réactivité, la transformation cellulaire s'accompagne d'une simplification de la partie glycannique des glycolipides, dans toutes les cellules quel que soit leur mode de transformation, *in vivo* ou *in vitro*, par virus à DNA ou RNA, par des carcinogènes chimiques et même dans les tumeurs spontanées. Les glycolipides des membranes sont alors inachevés et perdent les sucres terminaux : acide sialique des gangliosides, fucose des fucoglycolipides (conduisant à des modifications de groupe sanguin), perte de galactose ou de N-acétylgalactosamine terminal. Ces modifications sont détaillées dans les revues générales suivantes : HAKOMORI *et al.* (44), BRADY et FISHMAN (45), HAKOMORI (46), RICHARDSON *et al.* (47).

Des modifications importantes sont également démontrées en utilisant des cellules en culture, où la confluence des cellules induit une augmentation de la synthèse des glycolipides. Ce phénomène a été montré en particulier pour le céramide trihexoside, puis pour d'autres glycolipides neutres : globoside, antigène de FORSSMAN et pour les gangliosides. Les quantités de ces glycolipides peuvent augmenter de 50 à 100 %.

Ce phénomène est absent dans les cellules transformées (HAKOMORI : 48).

B - LES GLYCOPROTEINES

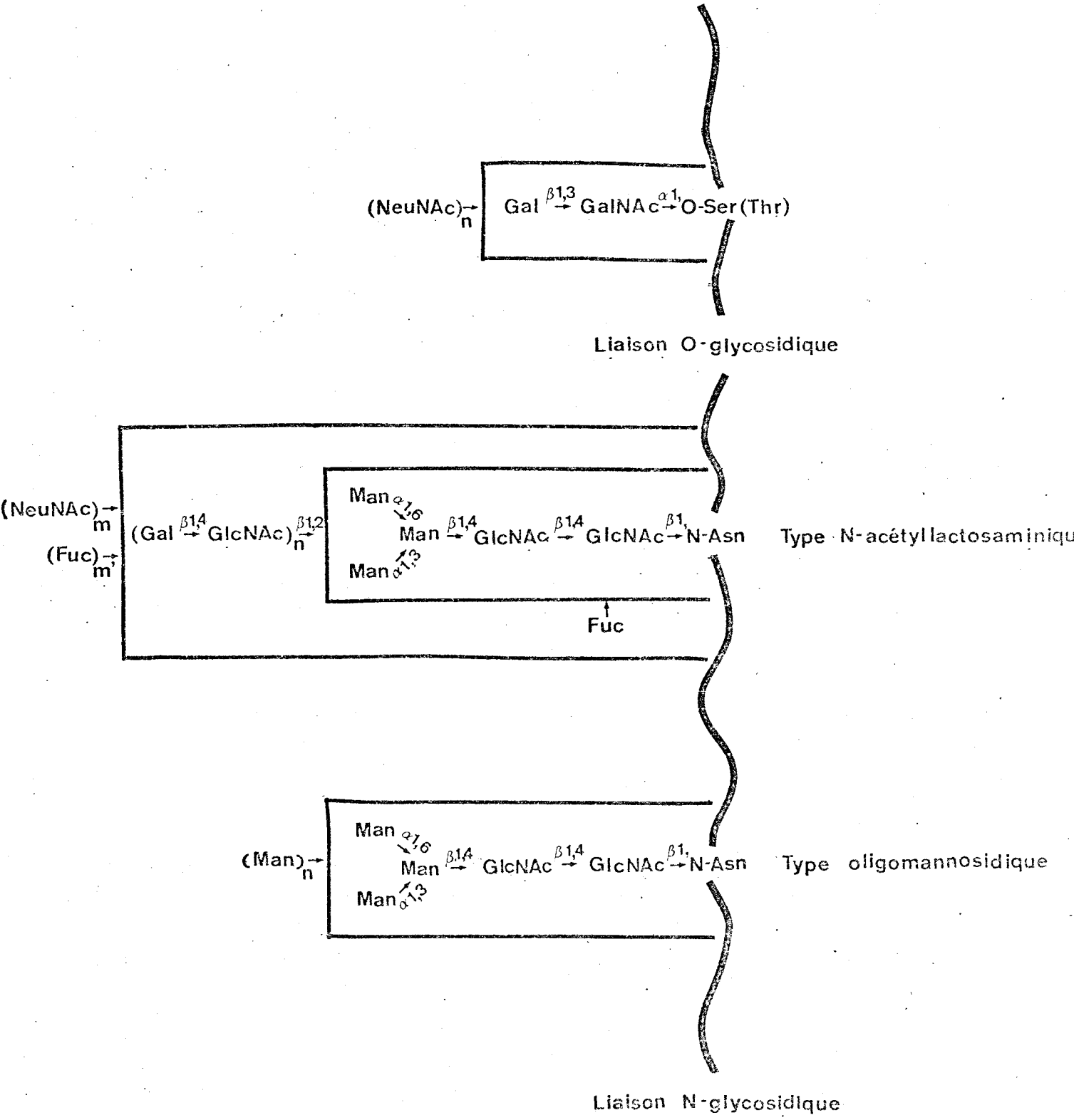
Les structures des glycoprotéines membranaires sont très mal connues. Les informations recueillies à ce jour proviennent presque exclusivement d'analogies faites avec les glycoprotéines solubles. Les difficultés sont nombreuses, les molécules portent en général plusieurs glycannes, l'extraction est difficile et demande d'abord une fraction membranaire isolée, puis l'emploi de détergents de manière à solubiliser les molécules. C'est pourquoi nombre d'auteurs se sont orientés vers une deuxième technique qui est l'attaque de cellules entières par des enzymes protéolytiques qui libèrent des glycopeptides solubles. Cette méthode est tout aussi délicate car les quantités de substances formées sont faibles et peuvent être contaminées par la libération de glycoprotéines intracellulaires due à la fragilisation des cellules lors de l'attaque protéasique.

Très peu de résultats ont été obtenus suivant la première méthode. En effet peu de glycoprotéines membranaires ont été isolées à l'état pur et en quantité suffisante pour achever des études structurales. On possède plus d'informations sur la structure des glycopeptides membranaires.

Quelle que soit l'approche méthodologique, les schémas de structure sont identiques à ceux trouvés pour les glycoprotéines solubles. Le tableau II résume les principaux types de glycannes qui ont été caractérisés dans les membranes plasmiques. On distingue les glycannes conjugués à la partie protéique par une liaison O-glycosidique que l'on retrouve dans les mucines (voir GOTTSCHALK *et al.*:49) et les glycannes conjugués par une liaison N-glycosidiquequi sont généralement des glycannes branchés (iso-glycannes). Ce deuxième type de glycanne est commun à un grand nombre de glycoprotéines sériques qui possèdent toutes le noyau pentasaccharidique suivant : α-Man-(1 $\rightarrow$ 3)-[α-Man-(1 $\rightarrow$ 6)-] -β-Man-(1 $\rightarrow$ 4)-β-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-β-GlcNAc (1 $\rightarrow$)Asn, sur ce noyau viennent se greffer soit des neuraminyl (ou fucosyl)-N-acétyllactosamine ou des résidus de mannose (voir les revues générales de MONTREUIL (50,51),et MONTREUIL et VLIEGENTHART (52). Ces types de glycannes ont été retrouvés dans les

TABLEAU II

STRUCTURE DES DIFFERENTS TYPES DE GLYCANNES LIES AUX GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES



glycoprotéines membranaires de cerveau, rein et foie de Rat par KRUSIUS et FINNE (53).

Nous examinerons les résultats obtenus avec les glycoprotéines isolées puis ceux obtenus avec les glycopeptides.

1 - Structures glycanniques déterminées avec des glycoprotéines membranaires isolées

La presque totalité de l'acide N-acétylneuraminique de la membrane de l'hématie humaine est liée à une seule molécule. Cette sialoglycoprotéine est appelée glycophorine A et peut être isolée des membranes érythrocytaires sous forme soluble grâce à un détergent non ionique suivant la technique mise au point par MARCHESI et ANDREWS (54). La séquence complète en amino-acides et le point d'attache des 16 glycannes ont pu être déterminés par TOMITA et MARCHESI (55). Quinze chaines oligosaccharidiques sont liées par des liaisons O-glycosidiques et la structure a été déterminée par THOMAS et WINZLER (56) et par ADAMANY et KATHAN (57) (Fig. 3). La structure du glycanne lié à l'asparagine n'est pas encore totalement connue. WINZLER a proposé un schéma dans lequel on retrouve le noyau trimannosidique (59) (Fig. 3) mais cette structure est incomplète et la structure exacte reste à déterminer.

Bien que d'autres glycoprotéines membranaires aient été isolées : 5'nucleotidase par EVANS et GURD (61) et pyrophosphatase par les mêmes auteurs

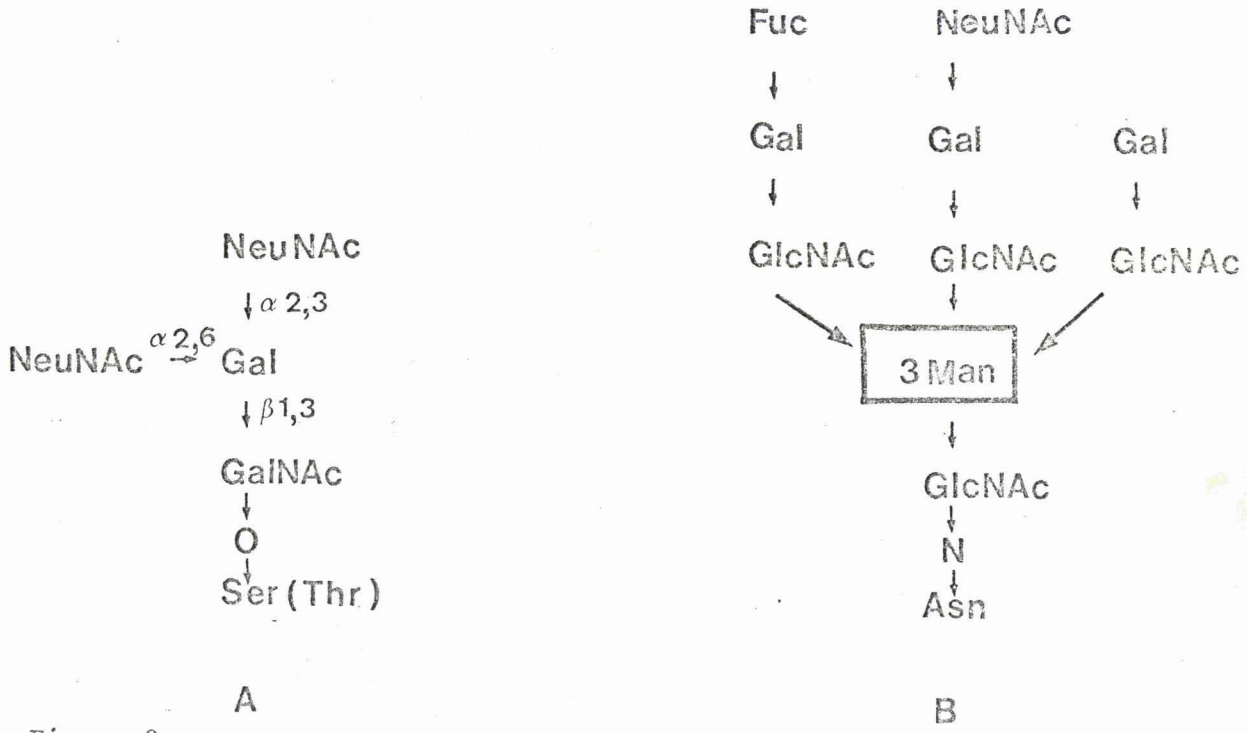


Figure 3 :

Structure des différents glycannes de la glycophorine A.
La structure A correspond aux glycannes liés par des liaisons O-glycosidiques d'après THOMAS et WINZLER (58), la structure B correspond au glycanne lié par une liaison N-glycosidique d'après WINZLER (60).

(62,63) à partir du foie de Rat, glycocalicine isolée des plaquettes sanguines humaines par l'équipe de JAMIESON (OKUMURA et JAMIESON :64 ; OKUMURA *et al.* :65), la CSP (cell surface protein) par YAMADA et WESTON (66) ou LETS (large external transformation sensitive) glycoprotéine par CARTER et HAKOMORI (67) encore appelée "galactoprotéine a" isolée des membranes de fibroblastes, la glycoprotéine majeure des membranes de l'hépatome ascitique AH66 par FUNAKOSHI et YAMASHIMA (68), aucune n'a abouti à la connaissance de la structure de sa (ses) partie (s) glycannique (s). Seul l'isolement du récepteur des asialoglycoprotéines d'hépatocyte de Rat par KAWASAKI et ASHWELL (69) a donné lieu à une étude structurale. La structure des deux glycopeptides est donnée dans la figure 4. On n'y retrouve pas le noyau trimannosidique, mais on reconnaît les deux types d'isoglycannes décrits précédemment.

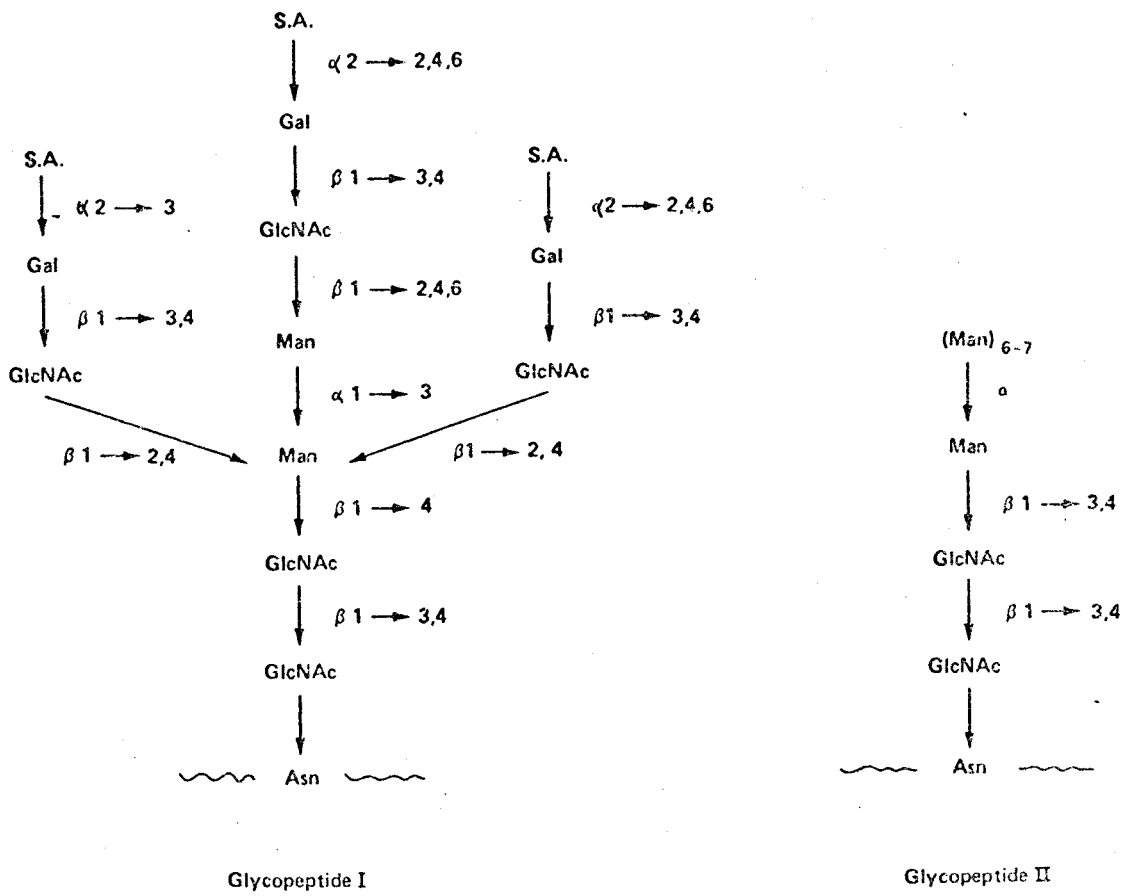


Figure 4 :

Structure des deux glycannes du récepteur hépatique des asialoglycoprotéines (KAWASAKI et ASHWELL : 70).

L'isolement de glycoprotéines membranaires par chromatographie d'affinité à l'aide de lectines insolubilisées a également été effectué. Les récepteurs de l'agglutinine du germe de blé (WGA) et du ricin (RCA) ont été isolés de l'hématie humaine par ADAIR et KORNFELD (71) ainsi que ceux de la concanavaline A (Con A) et de l'agglutinine de la lentille (LCPHA) par FINDLAY (72). Les récepteurs de la Con A ont été également isolés à partir des synaptosomes par ZANETTA et GOMBOS (73), à partir des lymphocytes de Souris par NILSSON et WAXDAL (74) et des cellules L par HUNT *et al.* (75), là non plus, aucune structure glycannique n'est connue.

2 - Structures glycanniques déterminées avec des glycopeptides membranaires

Bien que l'attaque protéolytique des cellules libère des glycoprotéines intracellulaires comme l'ont signalé JETT et JAMIESON (76), de nombreux auteurs ont employé cette technique pour isoler des glycopeptides membranaires.

L'attaque trypsique des cellules TA 3 (lignée Ha) a permis d'isoler des glycopeptides d'une masse moléculaire de 200 000 daltons (CODINGTON *et al.* : 77 ; SLAYTER et CODINGTON ; 78). Chaque cellule possède à sa surface 3 x 10^5 molécules qui contiennent une centaine de glycannes. Deux types de glycannes sont attachés à la protéine par des liaisons O-glycosidiques. Ils sont caractérisés d'une part par la longueur des chaînes oligosaccharidiques et d'autre part par la présence à l'extrémité non réductrice d'un résidu β-galactosyl terminal, ou d'un acide N-acétylneuraminique (SPRINGER *et al.* : 79) (Fig. 5).

Des glycopeptides ont été isolés par digestion pronasique de membranes plasmiques de l'hépatome ascitique AH 66 par l'équipe de YAMASHINA (FUNAKOSHI *et al.* : 81 ; NAKADA *et al.* : 82) ces molécules portent les deux types de glycannes O-et N-glycosidiques mais, comme dans le cas des sialoglycopeptides isolés par SMITH et WALBORG de l'hépatome AS-30 D (83) aucune structure n'est déterminée. Les deux types de glycannes N-et O-glycosidiques ont également été mis en évidence sur des glycopeptides trypsiques de mem-membranes plasmiques isolées d'hépatocytes de Rat (CACAN : 84) et par DEBRAY et MONTREUIL (85) sur des glycopeptides trypsiques d'une lignée établie d'hépatocytes en culture (cellules RL). Ces derniers montrent de plus l'existence de glycopeptides de type N-acétyllactosaminique et de type oligomannosidique.

Long-chain type
α-NeuNAc-(2→3)-β-D-Gal-(1→3 or 4)-D-GlcNAc-(1→2,4, or 6)-D-Gal-(1→3 or 4)-α-D-GalNAc-Ser(Thr)

1

β-D-Gal-(1→3 or 4)-D-GlcNAc-(1→2,4, or 6)-D-Gal-(1→3 or 4)-α-D-GalNAc-Ser(Thr)

2

Short-chain type
α-NeuNAc-(2→3)-β-D-Gal-(1→3 or 4)-α-D-GalNAc-Ser(Thr)

3

β-D-Gal-(1→3 or 4)-α-D-GalNAc-Ser(Thr)

4

α-D-GalNAc-Ser(Thr)

5

Figure 5 :

Structure des différents types de glycannes de l'épiglycanine des cellules TA_3 d'après CODINGTON *et al.* (80). Les glycannes 1 et 2 sont des glycannes à longue chaîne, les glycannes 3, 4 et 5 sont des glycannes courts.

L'emploi de lectines a parfois permis d'étudier la structure de certains glycopeptides membranaires. Le récepteur de la lectine d'*Agaricus bisporus* est un disaccharide β-Gal-(1 → 3)-GalNAc → Serine (Thréonine) (PRESANT et KORNFELD :86). D'après l'étude d'OSAWA de nombreuses lectines mitogènes se lient sur le chaînon $(Man)_3$ → GlcNAc → GlcNAc (TOYOSHIMA *et al.* : 87) mais ces études sont réalisées par compétition avec des glycopeptides de structures connues ce qui ne constituent pas une preuve directe de la structure des glycannes membranaires. La fixation de glycopeptides membranaires sur des colonnes de lectines insolubilisées a abouti à l'isolement du récepteur de la Con A des cellules de l'hépatome de NOVIKOFF ou AS-30 D par NERI *et al.* (88) et ROBINSON *et al.* (89). Le récepteur de la Con A a été séparé du récepteur de la lectine de *Robinia pseudoaccacia* dans les cellules hépatiques normales et tumorales (hépatome de Zajdéla) par DIEVARD et BOURRILLON (90) mais dans tous ces cas aucune structure n'est connue.

Si aucune séquence n'a pu être directement établie, l'utilisation des endo-β-N-acétylglucosaminidase H et D a permis à l'équipe d'ATKINSON de montrer la présence de glycopeptides N-glycosidiques de types oligomannosidique et de type N-acétyl lactosaminique dans des cellules humaines KL-2 (CECCARINI *et al.* : 91 ; MURAMATSU *et al.* : 92) et dans les cellules BHK 21 par l'équipe de KOBATA (OGATA *et al.* : 93). Il faut remarquer que comme dans le cas des gangliosides, des groupements disialosyl : α-N-acétylneuraminyl-(2 $\rightarrow$ 8)-N-acétylneuraminyl ont été trouvés dans les glycoprotéines membranaires par FINNE *et al.* (94).

3 - Variations de la composition et de la structure des glycoprotéines membranaires

Les variations de la composition et de la structure des glycoprotéines de la membrane plasmique sont le témoin de la vie sociale de la cellule. Ces variations sont de différents ordres : variation de la sialylation, disparition ou apparition de glycoprotéines, changement de type de glycannes.

L'augmentation de la sialylation des glycoprotéines membranaires dans les cellules tranformées semble être un phénomène général (VAN BEEK *et al.* : 95). Ce résultat est montré par des expériences de tamisage moléculaire des glycopeptides membranaires réalisées selon la méthode de WARREN *et al.* (96) qui montrent que par rapport à des cellules normales, les glycopeptides des cellules transformées contiennent un excès d'acide sialique. Cette richesse en acide sialique est proportionnelle à la capacité d'induire des tumeurs chez l'animal d'après les travaux de GLICK *et al.* (97, 98).

Une famille de glycoprotéines isolée du fibroblaste semble également être en relation avec la transformation néoplasique : il s'agit de la CSP également isolée sous le nom de "LETS protein" ou de "galactoprotein a". Cette glycoprotéine possède les particularités suivantes : c'est la glycoprotéine majeure de la membrane des fibroblastes comme l'ont démontré YAMADA et WESTON (99), elle est fortement marquée par des procédés de marquage spécifique des protéines et des glycoprotéines membranaires (marquage à l'iode catalysé par la lactoperoxydase et marquage du galactose à l'aide de la galactose oxydase) selon les travaux de HYNES et HUMPHRYES (100) et de GAHMBERG et HAKOMORI (101), son taux diminue ou elle disparaît après transformation par des virus oncogéniques (VAHERI et RUOSLAHTI : 102 ; BURRIDGE : 103 ; HYNES : 104), ajoutée au milieu de culture elle restaure la morphologie

normale, l'adhésion et l'inhibition de contact sur des fibroblastes transformés (YAMADA *et al.* : 105), elle est rapidement détruite par les protéases et augmente quand la culture arrive à confluence (GAHMBERG *et al.* : 106). Ces propriétés sont détaillées dans la revue générale de YAMADA et PASTAN (107). De plus la présence de la "galactoprotéine a" dans la membrane dépend de la phase où se trouve la cellule dans le cycle cellulaire, cette glycoprotéine apparaît en phase G_1 comme l'ont montré GAHMBERG et HAKOMORI (108).

Des variations dans la nature des glycannes sont notées en fonction de la croissance de la cellule : la membrane de cellules en multiplicatio serait enrichie en glycannes de type oligomannosidique par rapport aux cellules en repos où le type N-acétyl lactosaminique prédominerait (CECCARINI *et al.* : 109 ; MURAMATSU *et al.* : 110). Récemment par des méthodes immunologiques, des glycoprotéines possédant des glycannes analogues à ceux des gangliosides : les GM_1 ganglioprotéines, ou à ceux des globosides : les globoprotéines ont été trouvées par TONEGAWA et HAKOMORI (111). Les ganglioprotéines seraient dépendantes de la transformation cellulaire.

C - LES PROTEOGLYCANNES

Les protéoglycannes appelés également mucopolysaccharides ou glycoaminoglycannes sont des glycoprotéines (sauf pour l'acide hyaluronique) caractérisées par le fait que les glycannes linéaires sont formés par des enchaînements d'unités disaccharidiques : acide uronique-(1 → 3)-N-acyl osamine unies les unes aux autres par une liaison N-acyl osamine-(1 → 4)-acide uronique. Ces molécules peuvent être O-ou N-sulfatées et présentent une très forte microhétérogénéité. Le point d'attache avec la protéine se fait par l'intermédiaire d'une liaison entre le xylose et la sérine.

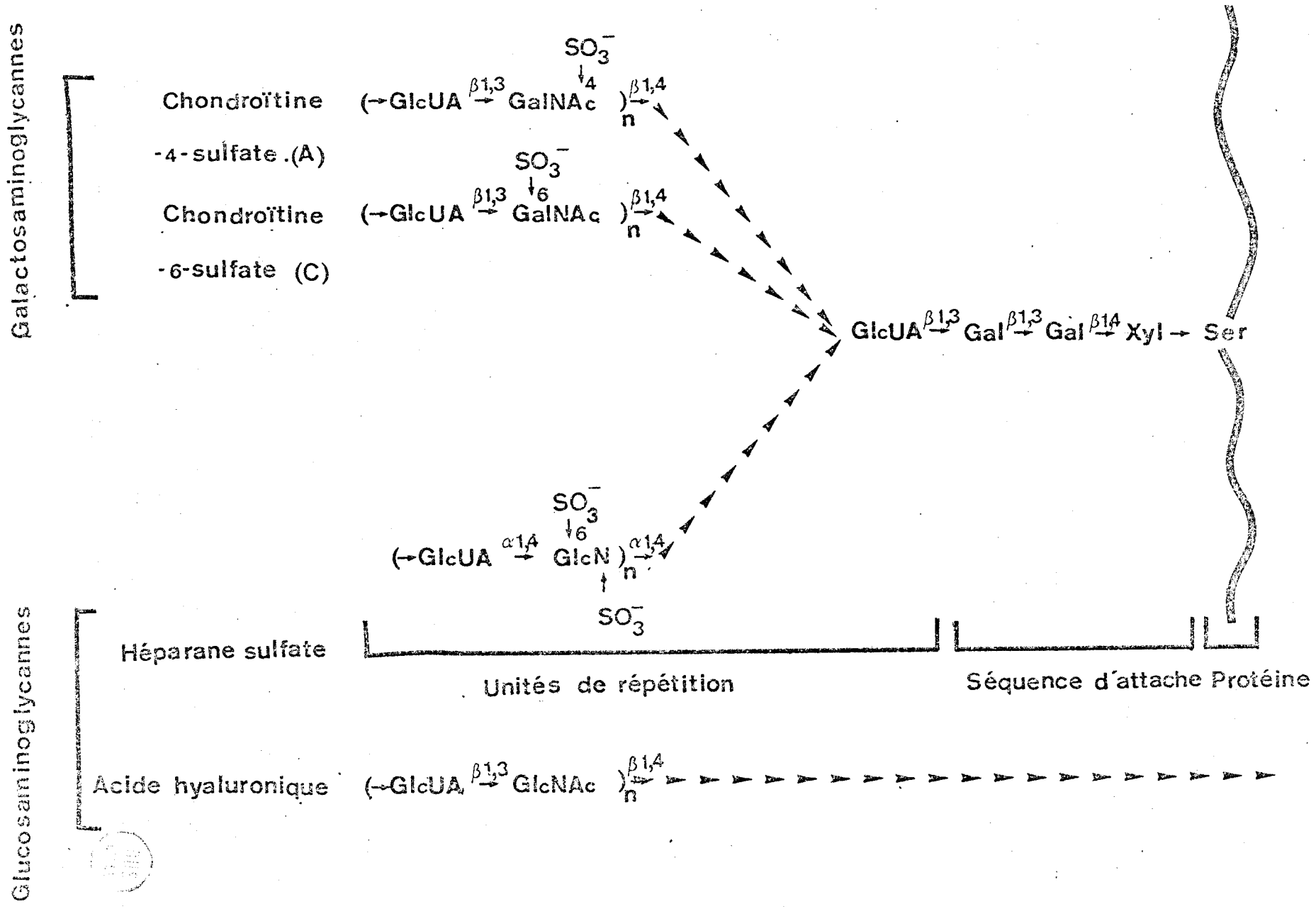
1 - Structure des protéoglycannes membranaires

Le tableau III montre la structure des protéoglycannes trouvés dans les membranes plasmiques. La présence d'héparane sulfate a été montrée par KRAEMER (112) dans des cultures de cellules de Hamster Chinois (CHO), cette même molécule a été retrouvée avec de l'acide hyaluronique dans des cellules de rein de singe vert (GMK) normales et transformées par le SV 40 par MAKITA et SHIMOJO (113). La masse moléculaire de l'héparane sulfate membranaire est d'environ 135 000 daltons (KRAEMER et SMITH : 114).

L'hydrolyse pronasique de membranes d'hépatome ascitique AH 130 FN libère du chondroïtine sulfate A (MUTOH *et al.* : 115), qui a été

TABLEAU III

STRUCTURE DES PROTEOGLYCANNES ISOLES DES MEMBRANES PLASMIQUES DE CELLULES DE MAMMIFERE



également purifié à partir de cellules de mélanome de souris B 16 par BHAVANANDAN et DAVIDSON (116). A partir de membranes synaptosomales et de myéline SIMPSON *et al.* (117) ont isolé outre de l'acide hyaluronique, une glycoprotéine sulfatée possédant du mannose et se distinguant par ses paramètres physicochimiques des protéoglycannes actuellement connus.

2 - Variations de la composition en protéoglycannes

Comme dans le cas des glycolipides et des glycoprotéines la nature et la quantité des protéoglycannes membranaires varient lors de la transformation cellulaire. La transformation virale réduit la quantité de protéoglycannes à la surface des cellules comme il a été montré pour les cellules 3T3 après transformation par le SV_{40} (SV 3T3) (ROBLIN *et al.* : 118 ; COHN *et al.* : 119). D'autre part la nature de ces glycoconjugués semble être modifiée en particulier l'héparane sulfate des cellules SV 3T3 semble posséder plus de charges que l'héparane sulfate des cellules 3T3 normales (UNDERHILL et KELLER : 120).

Lors d'études sur des cultures de cellules COHN *et al.* (121) ont montré qu'à forte densité cellulaire, on observe une augmentation du taux de chonchoïtine-6-sulfate et d'héparane sulfate et une diminution de l'acide hyaluronique.

II - LE ROLE DES GLYCOCONJUGUES DE LA SURFACE CELLULAIRE

Bien que ces composés soient en quantité mineure à la surface de la cellule, les glycoconjugués ont par leur glycanne des rôles biologiques extrêmement importants. Tous ces rôles ont un point commun : les glycannes sont des signaux de reconnaissance. Ce rôle général que peuvent jouer les glycannes a été tout d'abord suggéré par WINTERBURN et PHELPS (122) pour qui "les glycoprotéines sont synthétisées par des cellules pour des cellules" pour ces auteurs une glycoprotéinesynthétisée par une cellule reconnaît sa cellule cible grâce à son glycanne. Nous envisagerons dans ce chapitre le phénomène inverse où ce sont les glycannes des glycoconjugués membranaires qui reconnaissent soit des molécules solubles,soit d'autres cellules. Dans ce cas ce sont en général les monosaccharides externes qui interviennent pour coder le signal.

A - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE DETERMINANTS ANTIGENIQUES

1 - Déterminants antigéniques portés par les glycolipides

On connaît très bien à l'heure actuelle les déterminants antigéniques du système de groupe sanguin A, B, O. Les structures détaillées ont été élucidées grâce à des glycoprotéines de secrétion possédant les activités ABO, les structures ont été résumées d'après les revues générales de WATKINS (123) et de GINSBURG (124) dans le tableau IV. A cause des difficultés d'extraction et du faible rendement ce n'est que plus tard que les glycosphingolipides à activité ABO ont été isolés de la membrane d'hématie humaine. Le développement des techniques d'étude de la structure (méthylation, spectrométrie de masse) a permis de retrouver ces structures dans les glycolipides à activité O (déterminant H), A (KOŚCIELAK *et al.* : 128 ; HANFLAND : 129). C'est uniquement les sucres terminaux qui confèrent à la molécule ses propriétés antigéniques : résidu α-L-fucosyl pour le déterminant H, auquel s'ajoute soit le résidu α-D-Nacétylgalactosaminyl pour le déterminant A ou le résidu α-D-Galactosyl pour le déterminant B. L'utilisation d'exoglycosidase (α-galactosidase de grain de café) permet de faire disparaître l'activité B à la surface des hématies traitées par l'enzyme comme l'a montré l'équipe de SHARON (HARPAZ *et al.* : 130), ce type d'expérience permet de calculer le nombre de sites antigéniques qui serait de 2,2 10^6 sites par cellules et confirme la position externe des déterminants antigéniques.

Les antigènes du système Lewis (Le a et Le b) sont également de nature glycosphingolipidique. Les structures des déterminants ont été étudiées dans les membranes des hématies et dans les tumeurs humaines par HAKOMORI et STRYCHARD (131) et HAKOMORI et ANDREWS (132) et sont résumés dans le tableau IV. Mais ces antigènes sont captés par l'hématie à partir des lipoprotéines sériques et peuvent donc être considérées comme des antigènes extrinsèques (MARCUS et CASS : 133).

Le système de groupe sanguin P chez l'homme possède trois antigènes P1, P et P^K qui sont portés par des glycolipides : céramide trihexoside pour P^K, globoside pour P et céramide pentasaccharide pour P1 (NAIKI et MARCUS : 134). Ces structures sont représentées dans le tableau I, p. 7.

Un glycolipide à activité de groupe sanguin I a également été isolé par GARDAS (135) et une première hypothèse concernant la structure du déterminant antigénique a été formulée, elle est représentée dans le tableau IV.

TABLEAU IV

LES PRINCIPAUX DETERMINANTS ANTIGENIQUES PORTES PAR LES GLYCOLIPIDES DE LA MEMBRANE D'HÉMATIE HUMAINE

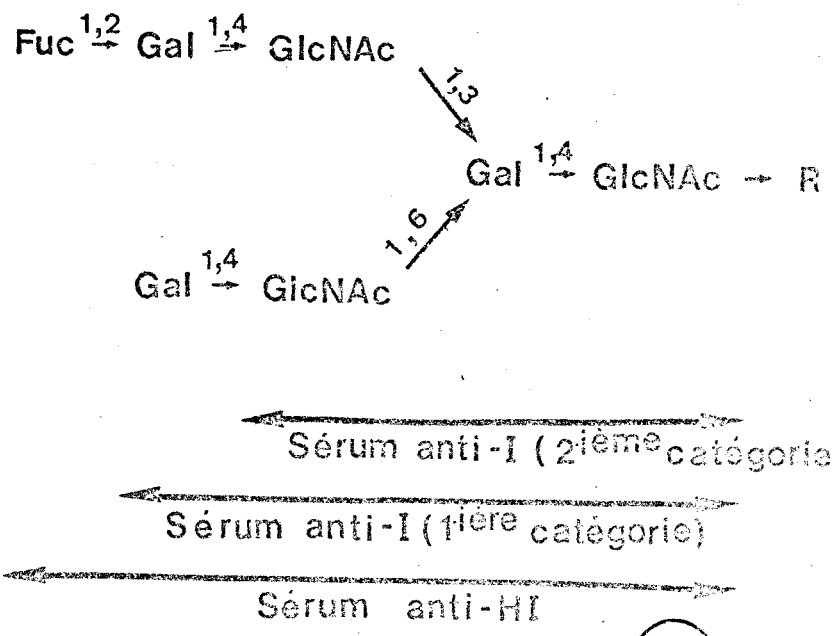
Déterminants antigéniques du système ABO d'après WATKINS (125).

Chaîne de type 1	Activité	Chaîne de type 2	Activité
$Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$		$Gal \xrightarrow{\beta 1,4} GlcNAc \rightarrow R$	
$Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	O	$Gal \xrightarrow{\beta 1,4} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	O
$GalNAc \xrightarrow{\alpha 1,3} Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	A	$GalNAc \xrightarrow{\alpha 1,3} Gal \xrightarrow{\beta 1,4} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	A
$Gal \xrightarrow{\alpha 1,3} Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	B	$Gal \xrightarrow{\alpha 1,3} Gal \xrightarrow{\beta 1,4} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc	B

Déterminants antigéniques du système Lewis d'après HAKOMORI et STRYCHARD (126).

	Activité
$Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,4$ Fuc	Le^a
$Gal \xrightarrow{\beta 1,3} GlcNAc \rightarrow R$, $\downarrow \alpha 1,2$ Fuc, $\downarrow \alpha 1,4$ Fuc	Le^b

Déterminants antigénique I d'après GARDAS (127).



BHS LILLE

2 - Déterminants antigéniques portés par les glycoprotéines

La présence de déterminants ABO dans les glycoprotéines de la membrane d'hématie a été longtemps contestée, il semble pourtant que plusieurs auteurs ont isolé de telles molécules (ANSTEE et TANNER :136 ; 137) Les déterminants ne seraient pas portés par une seule glycoprotéine mais par trois groupes de glycoprotéines érythrocytaires PAS-1, PAS-2, PAS-3 qui porteraient uniquement les déterminants de type 2.

La glycoprotéine majeure de l'hématie humaine : la glycophorine porte les déterminants M et N qui constituent le second système majeur de groupe sanguin (voir la revue générale de WINZLER 138). Les séquences oligosaccharidiques sont, là encore, responsables de l'activité antigénique. Il s'agit de glycannes liés à la protéine par des liaisons de type O-glycosidique. Ces antigènes sont facilement libérés de la cellule par les enzymes protéolytiques (COOK et EYLAR :139). Le tableau V montre la structure probable de ces antigènes d'après SPRINGER *et al.* (142). D'après cet auteur le déterminant M est obtenu par sialylation du déterminant N. Certains résultats tendent pourtant à prouver que des glycoprotéines différentes portent les activités N et M (WAŚNIOWSKA et DRZENIEK :143).

L'activité de groupe I est également retrouvée sur les glycoprotéines de la membrane de l'hématie (EBERT *et al.* : 144) et les déterminants sont portés par des chaînes oligosaccharidiques de type N-glycosidique. Il semble que cette glycoprotéine qui porte les déterminants I soit différente de la glycophorine.

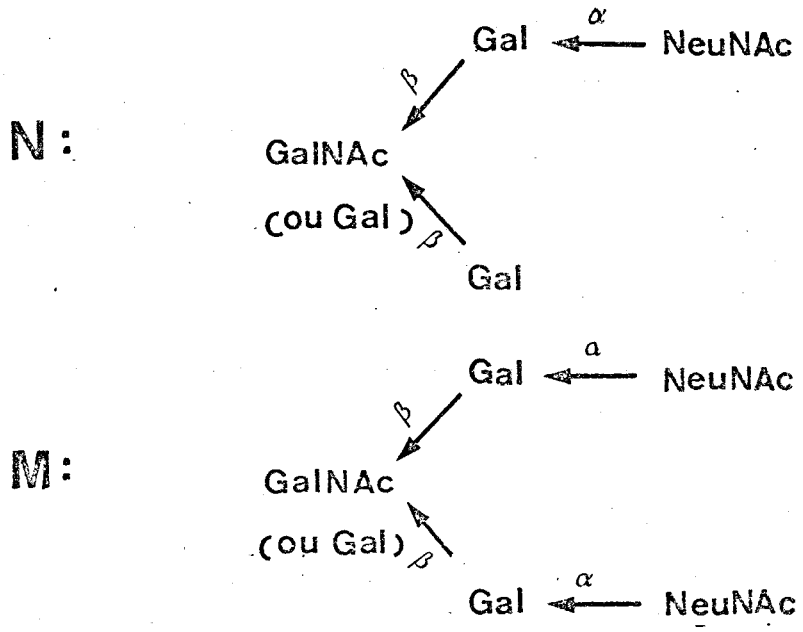
De nombreux antigènes membranaires sont de nature glycoprotéique par exemple les antigènes d'histocompatibilité parmi lesquels les antigènes du système H-2 chez la souris (voir les travaux de NATHENSON et CULLEN 145). Une structure hypothétique du glycanne est représentée dans le tableau V, mais il semble que, dans ce cas, le glycanne ne possède pas l'activité H-2.

La nature glycoprotéique de plusieurs antigènes a été démontrée. Par exemple les glycoprotéines Thy-1 isolées des thymocytes et du cerveau qui portent les antigènes théta (θ) sous ses deux formes alléliques θ-AKR et θC_3-17 (BARCLAY *et al.* : 146). Les glycoprotéines gp 70 et gp 45 de l'enveloppe virale du virus de Rauscher de la leucémie murine (MuLV) ont été isolées par MARQUARDT *et al.* (147), ce qui a permis de retrouver ces antigènes grâce à des méthodes immunochimiques à la surface de nombreuses lignées de cellules murines normales (CLOYD *et al.* : 148) et infectées par des virus (CLOYD *et al.* : 149).

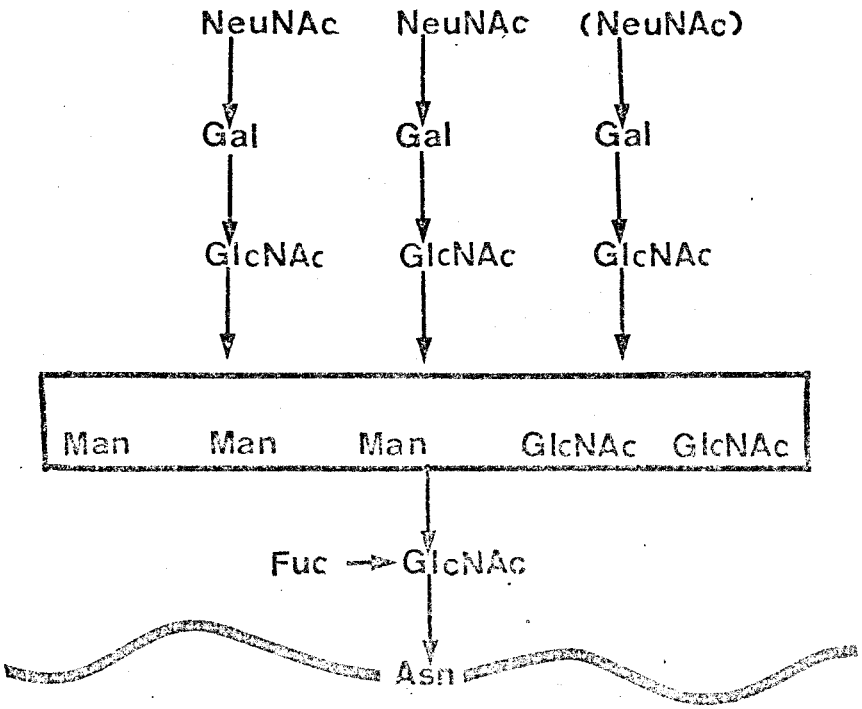
TABLEAU V

STRUCTURE DES GLYCANNES LIES A DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES POSSEDANT UNE ACTIVITE ANTIGENIQUE DANS LES CELLULES DE MAMMIFERE

Structure des déterminants antigéniques de groupe M et N, d'après SPRINGER *et al.* (140)



Structure hypothétique du glycanne des glycoprotéines H-2 d'après NATHENSON et CULLEN (141)



B - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE RECEPTEURS DE VIRUS

L'absorption d'un virus sur la membrane plasmique constitue l'évènement initial de la rencontre entre le virion et la cellule hôte. Les résidus monosaccharidiques terminaux jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance des virus avec la membrane cellulaire. Ce fait a particulièrement bien été démontré pour les myxovirus, les paramyxovirus et les réovirus.

L'interaction des myxovirus et des paramyxovirus avec les membranes cellulaires se fait par l'intermédiaire des résidus sialyl terminaux (voir par exemple GOTTSCHALK : 150). Les analogues à 8 et 7 atomes de carbone ne sont pas capables de fixer le virus de l'influenza (souche PR8) HUGHES (151), tandis que la souche asiatique (A_2) du même virus nécessite pour se fixer à la cellule, outre le radical tricarboné terminal, la présence du groupement O-acétyl en position 4 (PEPPER :152). La nature de la sialoglycoprotéine membranaire qui joue le rôle de récepteur dépend de sa richesse en résidus sialyl . Dans le cas du globule rouge, c'est la glycophorine qui joue le rôle de récepteur comme l'ont montré KATHAN *et al.* (153). La glycophorine est également le récepteur du virus de l'encéphalomyocardite (EMC) (ENEGREN et BURNESS :154). Les gangliosides semblent être impliqués dans la reconnaissance du virus Sendaï comme l'a montré HAYWOOD (155, 156). L'absorption du virus sur la membrane semble d'ailleurs déclencher un réarrangement des glycoprotéines et des glycolipides de la surface cellulaire (AOYAGI *et al.* :157)peut-être en relation avec les phénomènes de fusion membranaire.

L'intéraction des réovirus avec les membranes érythrocytaires nécessite la présence d'un résidu N-acétylglucosaminyl dans le récepteur membranaire (GELD et LERNER : 158).

Le récepteur de l'adénovirus (Type 2) des cellules KB a été isolé par plusieurs équipes en particulier par MEAGER *et al.* (159) et HENNACHE et BOULANGER (160) mais dans ce cas, bien que le récepteur soit une glycoprotéine, la partie glycannique ne semble pas directement impliquée dans la reconnaissance du virus par la cellule.

C - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE RECEPTEUR DE MOLECULES SOLUBLES

Les glycoconjugués membranaires peuvent également être des récepteurs pour des molécules solubles (toxines, hormones, asialoglycoprotéines).

Nous pouvons classer les évènements que déclenche la formation du complexe récepteur-ligand en deux catégories selon l'intervention ou non des nucléotides cycliques (en particulier de l'AMPcyclique) dans la réponse cellulaire. En effet, certains récepteurs sont couplés à l'adénylcyclase, c'est-à-dire que la reconnaissance du récepteur par le ligand conduit à une augmentation de l'activité adényl-cyclasique, donc à une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. D'autres récepteurs conduisent, après la fixation avec leur ligand spécifique, à des phénomènes biochimiques où l'AMPc n'intervient pas directement. Nous étudierons successivement ces deux types de récepteurs.

1 - Les récepteurs couplés à l'adényl-cyclase

Parmi ces récepteurs nous distinguerons les récepteurs de toxines et les récepteurs hormonaux.

a - Les récepteurs de toxines. En 1971 VAN HEYNINGEN *et al.* (161) montrent que les gangliosides isolés de cerveaux se lient à l'enterotoxine du *Vibrio cholerae*. C'est en 1973 que CUATRECASAS a identifié le récepteur au ganglioside GM_1 (162). D'une part une bonne corrélation est notée entre la teneur des membranes plasmiques en GM_1 et la réponse à la toxine (HOLLENBERG *et al.* : 163). D'autre part, l'incorporation de GM_1, dans des cellules ne possédant pas ce ganglioside (fibroblaste de souris NCTC 2071) induit une réponse à la toxine (MOSS *et al.* : 164). La fixation de la toxine sur le récepteur conduit à une activation de l'adényl-cyclase membranaire dans un grand nombre de tissus (FIELD : 165 ; FRANKS : 166), mais aussi à une modification de la perméabilité membranaire (MOSS *et al.* : 167) et à une redistribution des sialoglycolipides (SEDLACEK *et al.* : 168).

Les gangliosides se fixent également sur la toxine tétanique (VAN HEYNINGEN et MILLER : 169), mais dans ce cas le ganglioside le plus actif se révèle être le GD1b (VAN HEYNINGEN : 170).

b - Les récepteurs hormonaux. On sait aujourd'hui après les travaux de SUTHERLAND que les hormones polypeptidiques n'entrent pas dans la cellule cible. L'hormone se fixe à son récepteur membranaire et le message hormonal est transmis à la machinerie cellulaire par un 2ème messager : l'AMPc (SUTHERLAND et ROBISON : 171).

Les travaux de CUATRECASAS (172) ont montré que les récepteurs hépatocytaires et adipocytaires de l'insuline sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent être solubilisées par l'action de détergents comme le

Triton X-100. Les récepteurs conservent leur activité biologique après solubilisation et purification par chromatographie d'affinité sur des colonnes de lectines insolubilisées. La molécule purifiée est en effet retenue sur des colonnes de Concanavaline A et d'agglutinine de germe de blé (WGA) (CUATRECASAS : 173). La masse moléculaire du récepteur est de 300 000 daltons, la capacité de fixer l'hormone n'est pas diminuée après traitement à la neuraminidase, mais les résidus galactosyl ainsi exposés sont nécessaires à la reconnaissance. En effet un traitement séquentiel à la neuraminidase puis à la β-galactosidase fait disparaître la capacité de liaison à l'insuline (voir la revue générale de CUATRECASAS : 174).

Les glycosidases utilisées sur des cellules entières diminuent la réponse de la cellule à certaines hormones. Par exemple, le traitement des cellules corticosurrénales par la neuraminidase inhibe la production de stéroïdes en présence d'ACTH (HAKSUR *et al.* : 175). Dans ce cas il semble que le récepteur soit de nature glycoprotéinique et que l'acide sialique intervienne directement dans la fixation de l'hormone.

L'acide N-acétylneuraminique est également nécessaire à la fixation de la TSH sur les membranes thyroïdiennes (MOORE et FELDMAN : 176). En outre, dans ce cas, il y a compétition entre la toxine cholérique et la TSH au niveau du récepteur (MULLIN *et al.* : 177) mais l'inhibition maximale n'est que de 40 %. Une corrélation a été établie entre la présence de gangliosides dans la membrane, en particulier le GM_1 et le GD1a, et la capacité de fixer la TSH. En effet, une tumeur thyroïdienne (1-8R) déficiente en gangliosides a perdu la capacité de fixer l'hormone (MELDOLESI *et al.* : 178). Les gangliosides sont donc les récepteurs de la TSH, ce qui est confirmé par le fait que l'hormone se fixe sur des liposomes contenant ces glycolipides (ALOJ *et al.* : 179). Les parties du glycanne actives dans la reconnaissance sembleraient être les groupements disialosyl (MULLIN *et al.* : 180)

Des gangliosides possédant des groupements disialosyl interagissent fortement avec la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) (LEE *et al.* : 181) et avec la LH (LEE *et al.* : 182). Il semble que les hormones comme la TSH, l'HCG, la LH et la FSH qui ont une séquence peptidique commune avec la protéine B de la toxine cholérique, aient un mode de reconnaissance semblable de leur cellule cible qui résulte de l'interaction de leur partie protéique avec des structures gangliosidiques. Il semble également que les groupements disialosyl fassent partie du récepteur de la sérotonine (VAN HEYNINGEN : 183).

D'autres substances non hormonales agissent également par l'intermédiaire d'un récepteur glycoprotéique. Le facteur lymphocytaire qui inhibe la migration des macrophages (MIF) se fixe sur la membrane du macrophage sur un récepteur fucosylé (REMOLD : 184). Le résidu α-L-fucose joue un rôle important dans la fixation. Dans ce cas on ignore si la fixation du médiateur aboutit à l'activation de l'adényl cyclase.

2 - Les récepteurs non couplés à l'adényl cyclase

Certaines molécules possèdent un récepteur membranaire, mais la formation du complexe récepteur-ligand déclenche des phénomènes autres que ceux mettant en jeu l'AMPc par exemple la phagocytose ou la pénétration d'ions. Nous étudierons successivement ces deux types de réactions : d'abord le cas où le complexe récepteur-ligand conduit à la phagocytose ou pinocytose de molécules, phénomène mis en évidence par ASHWELL, puis le cas où le complexe récepteur-ligand conduit à la pénétration d'ions dans la cellule.

a - Les glycoprotéines désialylées injectées à des mammifères disparaissent très vite de la circulation. Ce mécanisme a été découvert par l'équipe d'ASHWELL en 1970 (VAN DEN HAMER *et al.* :185 ; MORELL *et al.* :186). Le mécanisme peut se résumer de la manière suivante : 1 - les asialoglycoprotéines sont reconnues par le foie et catabolisées par les lysosomes ; 2 - le signal de reconnaissance de la glycoprotéine est le résidu galactosyl démasqué par la désialylation ; 3 - cette clearance est un phénomène de tout ou rien. En effet si 2 des 10 acides sialiques de la céruléoplasmine sont détachés, la molécule disparaît rapidement de la circulation ; 4 - le remplacement des acides sialiques manquants restaure la durée de vie normale dans le sérum ; 5 - ce récepteur présent sur les membranes hépatocytaires est une glycoprotéine et sa sialylation est nécessaire à la reconnaissance (voir les revues générales de ASHWELL et MORELL (187 , 188)). La structure des deux glycannes des deux sous-unités du récepteur est indiquée dans la Figure 4. Le récepteur a été également isolé chez les Oiseaux où un système analogue existe, mais le signal de reconnaissance est, dans ce cas, la N-acétylglucosamine (LUNNEY et ASHWELL :189). Ce récepteur, en plus de sa fonction d'épuration des asialoglycoprotéines, serait capable de fixer des cellules comme les hématies. En effet il a été montré par JANCIK et SCHAUER (190) que le taux d'acide sialique détermine la durée de vie de ces cellules. La transfusion d'érythrocytes autologues partiellement disialylés montre que ces cellules disparaissent rapidement de la circulation et s'accumulent dans le foie où ils sont détruits.

Un système identique à celui du foie semble exister pour les enzymes lysosomiaux. En effet HICKMAN et NEUFELD (191) ont proposé une hypothèse attrayante sur l'origine des enzymes lysosomiaux : ces enzymes de nature glycoprotéique seraient secrétés par des cellules et reconnus par la membrane d'autres cellules. La reconnaissance enzyme-membrane déclencherait une phagocytose conduisant au stockage de ces enzymes dans les lysosomes. Des enzymes comme la β-glucuronidase, la β-galactosidase, la β-N-acétylglucosaminidase lysosomiales, injectées à des rats disparaissent rapidement de la circulation (STAHL *et al.* :192). Seule l'injection simultanée d'asialoorosomucoïde augmente le temps de survie ce qui suggère que la reconnaissance se fasse par l'intermédiaire des résidus N-acétylglucosaminyl. Dans ce système proche de celui d'ASHWELL on ne possède aucune information sur la nature du récepteur.

Dans certains cas, la liaison récepteur-ligand induit la pénétration d'ions dans la cellule réceptrice. En particulier, la transferrine possède un site récepteur sur le réticulocyte, cette glycoprotéine permet l'apport du fer nécessaire à la biosynthèse de l'hémoglobine. Le récepteur a été isolé par LEIBMAN et AISEN (193). Il s'agit d'un complexe glycoprotéique formé par la combinaison de deux sous-unités de masse moléculaire 176 000 et 95 000 daltons. La liaison avec la transferrine semble dépendre du glycanne de la grosse sous-unité.

La recherche des mécanismes par lesquels l'acétylcholine régule la perméabilité vis à vis des cations dans les membranes excitables a conduit à la caractérisation, à l'isolement et à la purification du récepteur. Les organes électriques d'*Electrophorus electricus* ou de diverses espèces de *Torpedo* ont été utilisés pour isoler par chromatographie d'affinité ce récepteur (voir la revue générale de CHANGEUX :194). Le récepteur est une glycoprotéine de masse moléculaire 270 000 daltons formée de sous-unités de 40 000 daltons. On ignore le rôle du glycanne dans la liaison avec l'acétylcholine. Par contre, on sait que sa liaison avec la glycoprotéine déclenche des modifications de conformation conduisant à l'ouverture d'une protéine ionophore responsable du passage transmembranaire des cations (GRÜNHAGEN et CHANGEUX : 195).

D - ROLE DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES DANS L'ADHESION ET LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE

La reconnaissance cellulaire puis l'adhésion sont les phénomènes qui président à la formation des tissus. Les cellules embryonnaires dissociées

grâce à l'EDTA ou à la trypsine se réassocient *in vitro* pour donner des structures tissulaires cohérentes (STEINBERG et ARMSTRONG : 196). Les glycoconjugués sont impliqués dans ce phénomène de reconnaissance mais les mécanismes exacts ne sont pas élucidés (voir, à cet égard, HUGHES :197). En effet les résultats obtenus avec les différents modèles expérimentaux ne permettent pas jusqu'à présent une explication unique du phénomène. Les différents concepts sont résumés dans la figure 6.

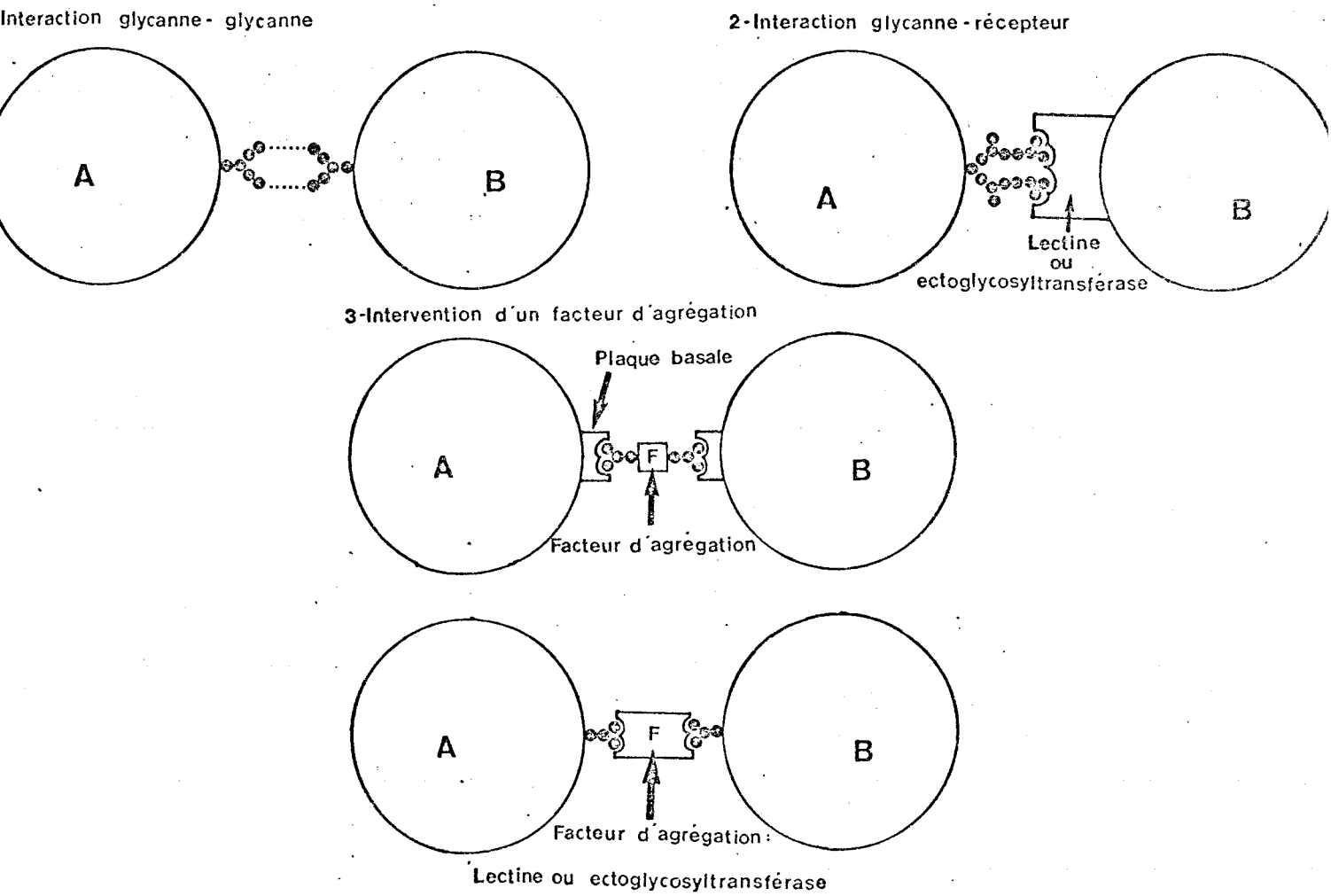


Figure 6 :

Différentes hypothèses concernant le rôle des glycoconjugués membranaires dans la reconnaissance des cellules eucaryotes.

1 - Interaction glycanne-glycanne

La possibilité de formation de ponts hydrogènes entre deux glycannes a été avancée pour expliquer l'adhésion cellulaire (JONES :198). Cet effet serait modulé par les charges portées par les acides sialiques, mais les résultats sont différents suivant les cellules étudiées. D'après KEMP, l'agrégation des cellules de muscles embryonnaires de Poulet est inhibée après traitement à la neuraminidase (199). La présence d'acide

sialique est également nécessaire pour la formation de colonies de lymphocytes dans la rate (TONELLI et MEINTS : 200). Par contre l'action de la neuraminidase augmente l'agrégation des cellules Hela (DEMAN *et al.* : 201), dans ce cas les forces d'adhésion sont atténuées par les acides sialiques de surface qui eux-mêmes voient leur effet modulé par l'ion Ca^{++}.

2 - Interaction glycanne-récepteur

La formation d'un complexe stéréospécifique entre un glycanne et un récepteur nécessite une structure glycannique particulière, susceptible d'être reconnue par le récepteur à l'exclusion d'autres glycannes. Dans beaucoup des systèmes cellulaires étudiés, on montre l'importance des résidus β-D-galactosyl . ROTH *et al.* (202), en utilisant les cellules de neurorétine embryonnaire de Poulet observent une perte de spécificité de la reconnaissance après traitement par la β-galactosidase. CHIPOWSKY, LEE et ROSEMAN (203) ont montré que des fibroblastes transformés par le virus SV 40 (SV 3T3) reconnaissaient spécifiquement des résidus galactosyl fixés de façon covalente sur des billes de Sépharose. L'utilisation de la lectine de *Ricinus communis* a permis de prouver que des cellules 3T3 en culture présentaient une augmentation des résidus galactosyl lorsqu'elles arrivaient à confluence (NICOLSON et LACORBIERE : 204). Les mutants des cellules BHK_{21} résistant à la toxine du Ricin (ricine) qui présentent une déficience en résidus galactosyl à leur surface (MEAGER *et al.* : 205) ont leur capacité de reconnaissance fortement diminuée.

Un modèle de ce type d'interaction est donné lors de la reconnaissance de la membrane du spermatozoïde par la membrane ovulaire avant la fécondation. Chez l'Oursin *Arbacia punctulata,* SCHMELL *et al.* (206) ont montré qu'un récepteur glycoprotéique de l'ovule reconnaissait un récepteur spécifique de la membrane du spermatozoïde.

Dans tous ces cas, il semble que ce soient des résidus monosaccharidiques terminaux qui jouent le rôle de signaux de reconnaissance. On peut classer ce mode d'interaction suivant la nature du récepteur qui peut être soit un enzyme : une ectoglycosyltransférase, ou une lectine membranaire Nous distinguerons ces deux cas dans la suite de l'exposé.

a - Le récepteur est une ectoglycosyltransférase

Les glycosyltransférases catalysent la réaction suivante : nucléotide — glucide + Accepteur → Accepteur — glucide + nucléotide, la

réalisation du complexe enzyme-substrat nécessite la reconnaissance par le site actif de l'enzyme de la partie glycannique de l'accepteur. ROSEMAN et son équipe ont proposé une hypothèse selon laquelle la formation du complexe enzyme-substrat entre une glycosyltransférase membranaire d'une cellule et un accepteur d'une autre cellule était responsable du phénomène de reconnaissance cellulaire (voir Fig. 7) qui résume l'hypothèse de ROSEMAN (208) et de ROTH *et al.* (209).

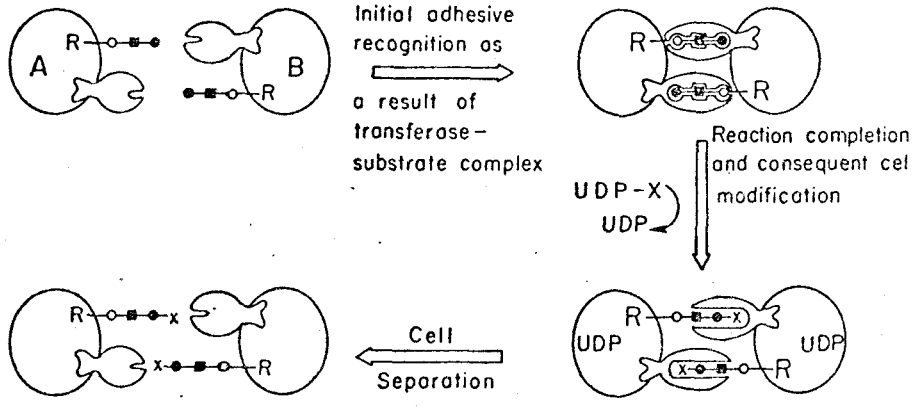


Figure 7 :

Représentation schématique du rôle possible des ectoglycosyltransférases dans le phénomène d'adhésion spécifique entre deux cellules A et B (d'après ROTH *et al.* : 207).

Cette théorie, énoncée pour les cellules de la neurorétine embryonnaire de poulet, a été étendue par ROTH et WHITE (210) aux fibroblastes de souris 3T3 où un processus de glycosylation de cellule à cellule (transglycosylation a été démontré et par McLEAN et BOSMANN (211) à la reconnaissance des gamètes de *Chlamydomonas*. L'adhésion de plaquettes sanguines au collagène serait également une interaction de ce type grâce aux ectoglycosyltransférases plaquettaires comme l'ont suggéré JAMIESON *et al.* (212) et BOSMANN (213).

Cette théorie du rôle des ectoglycosyltransférases dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire se heurte à plusieurs problèmes. D'une part les auteurs ne font pas de distinction entre la reconnaissance cellulaire et l'adhésion qui sont deux phénomènes biologiques distincts, comportant vraisemblablement deux mécanismes distincts. D'autre part l'intervention des précurseurs, c'est-à-dire des glycosyl-nucléotides est peu probable. En effet, les liquides extracellulaires n'en contiennent pas et leur présence au niveau membranaire est peu vraisemblable à cause de l'action des nucléotides-pyrophosphatases très actives à ce niveau. Enfin, la présence d'ectoglycosyltransférases est, dans de nombreux systèmes cellulaires, encore hypothétique (voir le chapitre ectoglycosyltransférase, p. 42).

b - Le récepteur est une lectine

L'étude de la "vie sociale" de l'Amibe *Dictyostelium discoïdeum* (MAC MAHON : 214) a permis de montrer que les glucides interviennent dans le phénomène de reconnaissance des cellules (REITHERMAN *et al.* : 215). Le contact se fait entre les lectines, appelées discoïdine I et II , d'une cellule et les glucides d'une autre cellule (RAHMSDORF *et al.* : 216). Des lectines analogues ont été isolées chez *Polysphondylium pallidum* (par ROSEN *et al.* :217). Leur mode d'action est résumé dans la revue générale de FRAZIER (218).

Des interactions lectines-glycannes ont aussi été mises en évidence dans des cellules de Mammifères. YAMADA *et al.* (219) ont montré que la glycoprotéine majeure des fibroblastes (CSP) est une agglutinine. Une lectine a été isolée des membranes plasmiques d'hépatocytes qui serait capable de reconnaître des membranes d'érythrocytes de lapin (BOWLES et KAUSS :220). Deux lectines seraient responsables de la reconnaissance des myoblastes L_6 avant leur fusion dont l'une seulement est inhibée par les thiodigalactosides (GARTNER et PODLESKI : 221). Dans ce cas, bien que l'existence de lectines ne soit pas mise en doute, leur rôle dans la fusion cellulaire n'est pas clairement établi (DEN *et al.* : 222). Des lectines ont enfin été mises en évidence par SIMPSON *et al.* (223) qui seraient en relation avec la formation des synapses dans le cortex cérébral.

Chez les Plantes, des travaux préliminaires montrent que la reconnaissance du pollen par le stigmate de *Gladiolus gandavensis* est un système analogue (KNOX *et al.* : 224), le stigmate portant des glycoprotéines réceptrices, qui se lient à des lectines exogènes comme la Concanavaline A.

3 - Intervention d'un facteur d'agrégation

La plupart des facteurs d'agrégation cellulaire isolés de diverses sources contiennent des sucres. Les cellules les plus étudiées sont celles des Eponges, par l'équipe de BURGER (TURNER et BURGER : 225 ; WEINBAUM et BURGER : 226 ; KUHNS *et al.* : 227). Les cellules de ces organismes sont dissociées par élimination des ions divalents (Ca^{++} et Mg^{++}) et se réassocient quand les cations sont ajoutés, cependant il faut ajouter un autre facteur perdu durant la dissociation. HENKART *et al.* (228) ont purifié ce facteur à partir de *Microciona parthena* : il s'agit d'une glycoprotéine de 2 000 000 de daltons de masse moléculaire possédant 50 % de sucre et dont la composition est voisine de celle des protéoglycannes. Il semble que l'acide glycuronique intervienne dans la liaison entre le facteur d'agrégation et une protéine membranaire : la plaque basale. Chez une autre éponge, *Geodia cydonium*, une sialyltransférase est associée au facteur d'agrégation (MÜLLER *et al.* : 229) et elle reconnaîtrait des glycannes membranaires.

Des facteurs d'agrégation ont été aussi isolés de cellules de Mammifères, en particulier de cellules rétiniennes embryonnaires où le signal de reconnaissance semble être la N-acétylgalactosamine, et de cellules du lobe cérébral où la N-acétylmannosamine tiendrait ce rôle (voir BALSAMO et LILIEN : 230). Une glycoprotéine serait un facteur d'agrégation des cellules de tératome, comme l'a montré OPPENHEIMER (231) et le galactose serait, là aussi, impliqué dans la reconnaissance.

E - ROLE ENZYMATIQUE DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

Certains enzymes intégrés dans les membranes plasmiques sont des glycoprotéines. La partie glycannique n'apparaît plus dans ce cas comme un signal de reconnaissance, mais il semble qu'elle permette l'orientation de l'enzyme dans la membrane. Nous citerons les enzymes le plus couramment retrouvés à la surface cellulaire et dont la nature glycoprotéique a été bien démontrée.

1 - La 5'-nucléotidase est une ectoenzyme spécifique de la membrane plasmique (TRAMS et LAUTER : 232). L'enzyme a été purifié par EVANS et GURD (233) à partir d'hépatocytes de Souris, il s'agit d'une glycoprotéine de masse moléculaire 150 000 daltons . L'activité de l'enzyme est fortement diminuée lorsque les cellules sont traitées à la Concanavaline A, aussi bien dans les cellules gliales (clone C6), comme l'ont montré STEFANOVIC, MANDEL et ROSENBERG (234), que dans les lymphocytes (DORNAND *et al.* : 235).

2 - La nucléotide pyrophosphatase est une sialoglycoprotéine de 130 000 daltons isolée de la membrane d'hépatocyte de Souris par EVANS (236) puis par BISCHOFF *et al.* (237).

3 - L'ectogalactosyltransférase isolée de la surface des globules rouges de lapin est la seule ectoglycosyltransférase dont la nature glycoprotéique ait été démontrée. D'après l'équipe d'ISSELBACHER, cet enzyme serait le récepteur de la ConcanavalineA pour ces cellules et possèderait un glycanne de type oligomannosidique (voir PODOLSKY *et al.* : 238). Incorporé dans les globules rouges humains, l'enzyme les rend agglutinables par la ConcanavalineA.

4 - L'ATPase (Na^+-K^+) est formée de deux sous-unités : la sous-unité catalytique et une glycoprotéine associée (RHEE et HOKIN : 239). La sous-unité glycoprotéique est dirigée vers le côté extracellulaire et semble être le site de fixation de l'ouabaïne (JEAN et ALBERS : 240). L'enzyme purifié ne semble pas affecté par la liaison avec la Concanavaline A (MARSHALL : 241) contrairement à la stimulation observée par NOVOGRODSKY sur des cellules entières (242).

5 - L'acétylcholinesterase isolée des membranes d'*Electrophorus electricus* par l'équipe de MASSOULIE (BON *et al.* : 243) est formée de quatre sous-unités de masse moléculaire 80 000 daltons qui sont des glycoprotéines possédant 14 % de sucre. Ce tétramère s'associe à un prolongement de nature protéique (collagène) qui permet l'ancrage dans la membrane (voir la revue générale de SILMAN : 244).

6 - L'aminopeptidase isolée des entérocytes et des bordures en brosse de cellules rénales de Porc est une glycoprotéine. Ce métalloenzyme (2 atomes de zinc par molécule) est une glycoprotéine transmembranaire formée de trois sous-unités (LOUVARD *et al.* : 245) dont le site actif et la partie glycannique sont situés à l'extérieur de la cellule.

Si on ne connaît pas le rôle de la partie glycannique des enzymes dans l'activité catalytique, on a quelques arguments sur leur rôle dans la modulation de cette activité. En effet la désialylation d'astroblastes (clone N-N) ou de cellules de neuroblastome (clone S 21, N 18, et N 115) provoque, d'après STEFANOVIC, MANDEL et ROSENBERG, une activation de certains ectoenzymes : l'acétyl et la butyrylcholinestérase (246) et l'ecto-pyrophosphatase (inorganique) (247).

F - ROLE DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES DANS LE CONTRÔLE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE

Si les glycoconjugués ne sont pas impliqués directement dans le phénomène de perméabilité qui fait appel plutôt aux canaux ou aux transporteurs membranaires, il semble que la perméabilité à certains ions ou à certaines substances soit contrôlée par les glycannes des glycoconjugués. Nous examinerons successivement le contrôle de la perméabilité aux cations, aux anions et à l'eau et enfin aux drogues.

1 - Contrôle de la perméabilité aux cations

C'est la perméabilité aux ions K^+ qui semble dépendre le plus de la structure des glycoconjugués membranaires, en particulier de l'acide sialique. GLICK et GITHENS (248) ont montré qu'il régulait la perméabilité vis à vis de ce cation dans les cellules leucémiques L 1210. En outre, le traitement de l'hématie par le periodate de sodium dans des conditions qui réalisent sélectivement l'oxydation des fonctions α-glycol des glycannes s'accompagne d'une perte considérable en ions K^+ (BROSSMER et BOHN : 249).

2 - Contrôle de la perméabilité aux anions et à l'eau

Le sérum de certains poissons antarctiques, comme *Trematomus borchgrevinki*, contient des glycoprotéines dites "antigel " qui sont à molarité égale 200 à 500 fois plus efficacesque la Nacl (SHIER *et al.* : 250) et abaissent de 2° C le point de congélation du sang de ces animaux. La capacité des glycoprotéines d'interagir avec les molécules d'eau semble se retrouver au niveau membranaire.

La figure 8 montre, d'après ROTHSTEIN *et al.* (252), un modèle hypothétique de l'ionophore responsable de la perméabilité aux anions. Un tel système a été récemment isolé dans le globule rouge par WOLOSIN *et al.* (253) et montre une association entre une protéine dimérique (la bande 3) et la sialoglycoprotéine majeure : la glycophorine (voir la revue générale de SHAMOO et GOLDSTEIN : 254).

3 - Contrôle de la perméabilité aux drogues

L'utilisation de cellules ovariennes de Hamster Chinois (CHO) résistantes à la colchicine (CH^R) a permis d'étudier la diffusion de cette drogue dans ces cellules.

L'entrée de la colchicine y est fortement diminuée et seuls des agents tensioactifs sont capables de stimuler l'entrée de la drogue (CARLSEN *et al.* : 255). Cette propriété est maintenue grâce à l'ATP

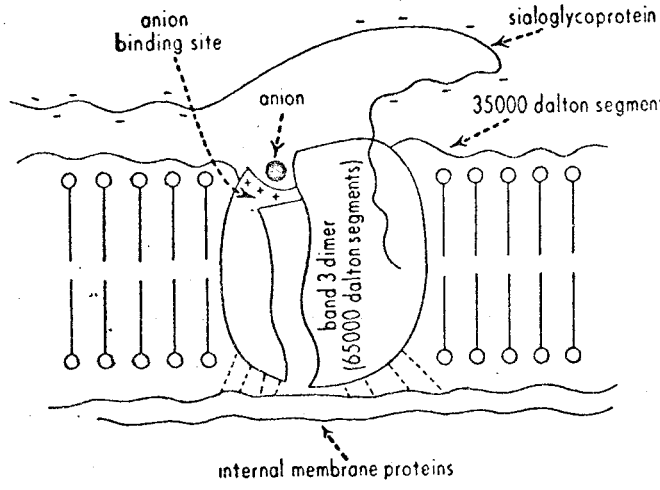


Figure 8 :

Schéma hypothétique du transport des anions dans la membrane du globule rouge humain d'après ROTHSTEIN *et al.* (251).

intracellulaire par la phosphorylation de deux glycoprotéines de surface de haut poids moléculaire (CARLSEN *et al.* : 256).

G - ROLE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE DANS LE DECLENCHEMENT DE LA MITOSE

Le dernier rôle attribué aux glycoconjugués de surface est celui qui est le moins bien connu. Ce n'est pourtant pas le moins important. Il s'agit du déclenchement de la mitose. En effet, la liaison de certains glycoconjugués de surface avec un ligand, ou leur modification chimique induit une transformation blastique puis une mitose chez le lymphocyte. Nous étudierons successivement le cas où le ligand est un antigène, le récepteur étant dans ce cas un anticorps de surface, puis celui où le ligand est une lectine, le récepteur étant alors une glycoprotéine membranaire et enfin le cas des modifications chimiques des glycoconjugués.

1 - Le ligand est un antigène

Les lymphocytes portent à leur surface des immunoglobulines (MARCHALONIS *et al.* : 257). Ces glycoprotéines ont été isolées de la surface des lymphocytes B et T et correspondent à des Ig M monomériques et à des Ig D (voir la revue générale de MARCHALONIS : 258). Ces deux types d'immunoglobulines possèdent des propriétés différentes de celles des immunoglobulines de sécrétion . Les Ig M de la membrane de splénocytes de Souris ont une densité moindre que les Ig M intracellulaires ou sécrétées et que les IgD membranaires (MELCHER et UHR :259). Ces différences de densité semblent refléter des différences dans la glycosylation des molécules. Les immunoglobulines de surface sont intégrées dans la membrane par la partie C-terminale des chaînes peptidiques tandis que le site de reconnaissance antigénique et le (s) glycanne (s) sont dirigés vers l'extérieur. D'après VITETTA et UHR (260), c'est la liaison entre les Ig D et l'antigène qui déclencherait la transformation blastique et la mitose des lymphocytes B. Dans ce cas on ignore le rôle de la partie glucidique de ces molécules.

2 - Le ligand est une lectine

Un certain nombre de lectines possèdent la propriété de transformer "*in vitro*" les lymphocytes en culture. Dans ce cas c'est le glycanne du récepteur qui intervient pour déclencher la réponse lymphocytaire.

Dans certains cas, les récepteurs sont les résidus monosaccharidiques appartenant à l'extrémité non réductrice du glycanne. La lectine extraite de l'hémolymphe de *Limulus polyphemus* (ou limuline) exerce un effet mitogénique sur les lymphocytes périphériques humains en se fixant sur les séquences suivantes : NeuNAc→ GalNAc ou NeuNAC → Gal→ GlcNAc → Man, comme l'ont démontré ROCHE *et al.* (261). Les agglutinines de *Ricinus communis* et de *Abrus precatorius* induisent la transformation des lymphocytes en se fixant, d'après CLOSS *et al.* (262), sur les résidus β-galactosyl Après désialylation de la membrane lymphocytaire, les résidus β - galactosyl et N-acétylgalactosaminyl ainsi "découverts" permettent à l'agglutinine du Soja (SBA) de produire un effet mitogénique (NOVOGRODSKY et KATCHALSKI : 263).

Des lectines mitogènes possèdent des sites de fixation beaucoup plus complexe et non encore identifiés (voir à ce sujet le travail de TOYOSHIMA *et al.* 264). La concanavaline A et la succinylconcanavalineA (HADDEN *et al.* : 265), la PHA de *Phaseolus vulgaris* (ALLAN et CRUMPTON : 266), l'agglutinine de *Phytolacca americana* (PWM) (WAXDAL :267), celles de *Pisum sativum*

(BERNARD-GRIFFITHS *et al.* : 268) et de *Robinia peudoaccacia* (SHARIF et BOURRILLON : 269) présentent des activités mitogènes qui ne sont pas inhibées par compétition avec des sucres simples, mais par des glycopeptides de structure complexe .

3 - Modifications chimiques des glycoconjugués de surface

Depuis la découverte de NOVOGRODSKY et KATCHALSKI (270) de la transformation lymphocytaire par le periodate de sodium 10^{-3}M dans des conditions très douces, un grand nombre de recherches ont été entreprises pour tenter de découvrir le point d'impact de ce réactif. Les travaux peuvent se résumer de la manière suivante :

a - La formation des fonctions aldéhydiques est nécessaire à l'apparition de la transformation blastique (NOVOGRODSKY et KATCHALSKY : 271). En effet, un traitement séquentiel par la neuraminidase, puis par la galactose oxydase produit le même effet, comme l'ont montré NOVOGRODSKY et KATCHALSKI (272) et DIXON *et al.* (273).

b - Le traitement à la neuraminidase réduit la réponse au periodate (MONAHAN *et al.* :274).

c - L'oxydation de l'acide sialique semble déclencher le phénomène, comme le montre l'apparition d'acide 5-acétamido-3,5-didésoxy-L-arabino-7-aldéhydo-2-heptulosonique (PRESANT et PARKER : 275).

d - Les agents de blocage des groupements aldéhydiques inhibent le phénomène (DIXON *et al.* :276).

Récemment une analogie a été établie entre le mode d'action des lectines mitogènes et celui du periodate. Il semble que dans les deux cas le mécanisme soit indirect (BEYER et BOWERS :277) et que quelques cellules libèrent sous leur action un facteur de croissance qui stimulerait les autres cellules (MONAHAN *et al.* :278).

LE MÉTABOLISME DES GLYCOCONJUGUÉS DE SURFACE

Après avoir étudié la structure et le rôle des glycoconjugués membranaires, nous nous proposons de passer en revue les hypothèses concernant la biosynthèse, la réparation et la dégradation des glycoconjugués de surface. Il est en effet important de connaître comment ces composés qui jouent un rôle biologique capital sont synthétisés et intégrés dans la membrane plasmique et comment ils peuvent y être maintenus et réparés. Nous étudierons successivement, le renouvellement des glycoconjugués membranaires, les diverses hypothèses concernant la biosynthèse et le catabolisme de ces composés.

I - LE RENOUVELLEMENT DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES

L'étude du renouvellement métabolique des glycoconjugués membranaires en utilisant des cultures de fibroblastes (cellules L) a été effectuée par WARREN et GLICK (279). Ces auteurs ont montré qu'il existait une synthèse et une dégradation constante des glycoconjugués dans les membranes plasmiques que les cellules soient en phase de croissance ou au repos Dans les cellules en croissance le matériel nouvellement synthétisé est utilisé pour accroître la surface de la membrane et le renouvellement est lent. Au contraire, dans les cellules au repos celui-ci est rapide, c'est-à-dire que l'incorporation du matériel nouvellement synthétisé s'accompagne d'une perte de molécules déjà intégrées dans la membrane. D'après ces auteur le renouvellement n'est pas très différent pour les protéines, les lipides et les sucres. Ce résultat n'a pas été confirmé par d'autres auteurs pour lesquels la composition en sucre de la membrane varie par rapport à la quantité de protéines.

L'étude de l'incorporation des glucides dans la membrane plasmique de cellules de mastocytome (souche P815Y) entreprise par GRAHAM *et al.* (280) montre qu'il existe une fluctuation du rapport glucides/protéines Ce rapport est élevé en phase G_1 révélant une synthèse et une insertion importante dans la membrane pendant cette phase. Le fucose est incorporé au début et la glucosamine à la fin de la phase G_1. La phase S est caractérisée par un rapport faible. Le rapport s'élève de nouveau en fin de S et en début de G_2 principalement à cause de l'incorporation d'acide sialique. Les cellules mitotiques (en phase M) sont donc plus sialylées que les cellules en interphase. L'étude de l'incorporation de la glucosamine durant la

phase M montre que la synthèse des glycoconjugués s'arrête 20 à 30 minutes avant que les cellules n'entrent en mitose et reprend seulement durant la télophase (fin de la phase M (KUBASOVA *et al.* : 281).

L'étude du métabolisme des glycoconjugués de surface a également été entreprise en envisageant la possibilité de réparation. Après action de la trypsine ou de la neuraminidase sur des cellules BHK_{21}(C-13), BUCK et WARREN (282) ont montré que la réparation de la partie détériorée des glycoconjugués de surface était nulle ou très faible, et que le remplacement de l'acide sialique à la surface de ces cellules s'effectuait par échange de la molécule entière du sialoglycoconjugué. Au contraire, HARMS et REUTTER (283) ont montré que la demi-vie de l'acide sialique dans les membranes plasmiques d'hépatocytes était beaucoup plus courte que la demi-vie des amino-acides, ce qui montre l'existence de deux métabolismes indépendants et d'une possibilité de réparation.

Il semble également que le "turn over" des glycoprotéines soit hétérogène . En effet, en utilisant des cellules de neuroblastome (lignée N2a), HUDSON et JOHNSON (284) ont montré que les quatre glycoprotéines fucosylées de ces membranes possédaient des vitesses de renouvellement très différentes.

L'étude du métabolisme des glycoconjugués membranaires conduit donc à deux questions : comment ces molécules sont-elles biosynthétisées et intégrées dans la membrane ? Comment sont-elles dégradées ?

II - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE

Deux hypothèses tentent de répondre à cette question qui se distinguent par la localisation des enzymes de la biosynthèse, c'est-à-dire des glycosyltransférases.

Selon la première, la biosynthèse s'effectuerait grâce aux glycosyltransférases intracellulaires et l'intégration de la vacuole golgienne dans la membrane plasmique amènerait les glycoconjugués à la surface de la cellule : c'est l'hypothèse du "membrane flow".

La seconde hypothèse prévoit l'existence d'ectoglycosyltransférases qui permettrait une biosynthèse en surface. Nous examinerons ces deux hypothèses.

1 - L'hypothèse du "membrane flow"

Un bon modèle illustrant cette hypothèse du "membrane flow" nous est donné par la biosynthèse des glycoprotéines d'enveloppes virales. Ces

glycoprotéines sont d'abord détectées dans les membranes intracellulaires, puis 30 minutes après l'infection, elles apparaissent à la surface de la cellule hôte (voir les travaux d'ATKINSON : 285 et d'ATKINSON *et al.* : 286). La glycosylation de telles molécules est donc réalisée dans le réticulum endoplasmique par les glycosyltransférases de l'hôte et l'intégration à la surface se ferait par fusion des vésicules golgiennes avec la membrane plasmique. Ce processus appelé "membrane flow" a été proposé par PALADE en 1959 (287). Le mécanisme du transit intracellulaire est une énigme, bien que des tentatives pour visualiser le phénomène aient été effectuées, par exemple lors de la division de l'oeuf de *Xenopus laevis* par BLUEMINCK et DE LAAT (288). Ces auteurs ont montré que des "cisternae" du réticulum endoplasmique représentaient le précurseur membranaire qui s'incorporait à la membrane durant la cytokinèse.

Cette hypothèse a connu un développement récent grâce à la théorie de ROTHMAN et LENARD (289) selon laquelle les ectoprotéines sont synthétisées par les ribosomes liés aux membranes comme le sont les endoprotéines (Figure 9). Mais ces ectoprotéines possèderaient une séquence

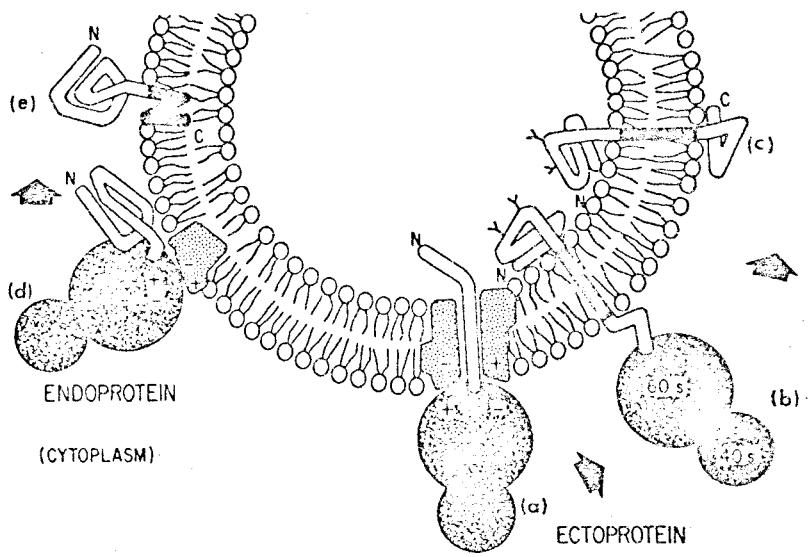


Figure 9 :

Mécanismes pour la biosynthèse et l'intégration des protéides membranaires : a, b, c : ectoprotéines et ectoglycoprotéines ; d, e : endoprotéines (d'après ROTHMAN et LENARD : 290).

terminale d'aminoacides permettant la reconnaissance d'un récepteur protéique lié au ribosome ce qui lui permettrait le passage au travers de la membrane du réticulum endoplasmique. La glycosylation s'effectuerait ensuite grâce aux glycosyltransférases intracellulaires d'abord du réticulum, puis de l'appareil de Golgi. Le cytosquelette (microtubules, microfilaments) permettrait l'intégration de ces vésicules golgiennes dans la membrane. Cette théorie a le mérite d'expliquer à la fois l'asymétrie et l'intégration des glycoprotéines membranaires : la partie glycosylée dans la "cisterna" du réticulum endoplasmique devenant extracellulaire, grâce à la fusion, la partie hydrophobe servant de point d'ancrage dans la membrane.

2 - La biosynthèse par les ectoglycosyltransférases

Une hypothèse entièrement différente peut être envisagée selon laquelle la biosynthèse des glycoconjugués membranaires s'effectuerait grâce à des enzymes spécifiques de la membrane plasmique : les ectoglycosyltransférases.

Selon la définition de DePIERRE et KARNOVSKY (291), les ectoenzymes sont des enzymes membranaires dont le site actif est accessible à l'extérieur de la cellule. Les ectoglycosyltransférases sont des ectoenzymes capables de transférer des monosaccharides à partir d'un précurseur nucléotidique sur un accepteur glycoprotéique ou glycolipidique. L'intervention d'ectoglycosyltransférases dans la biosynthèse des glycoconjugués membranaires nécessite la présence d'enzymes fonctionnels sur la membrane, du précurseur et de l'accepteur.

La première difficulté vient des divers modèles utilisés pour cette étude. En effet, l'hypothèse d'une biosynthèse totale d'une glycoprotéine (ou d'un glycolipide) à la surface d'une cellule, ne peut être défendue que si la membrane cellulaire possède toutes les glycosyltransférases nécessaires. La figure 10 montre bien que toutes les ectoglycosyltransférases ont été mises en évidence, mais sur des cellules très différentes, la présence de la série complète d'enzymes sur la membrane d'une même cellule n'a démontrée que dans le cas des cellules intestinales par WEISER (311) et ISSELBACHER (312). Ces auteurs ont caractérisé au niveau des cellules des cryptes, des glycoprotéines de surface incomplètes et des ectogalactosyltransférases en abondance, tandis que les cellules des villosités qui possèdent des glycoprotéines de membrane achevées ont une forte activité ectosialyltransférasique. La présence d'ectosialyl-, d'ectofucosyl- et d'ectogalactosyltransférases a été notée dans des fibroblastes normaux de souris

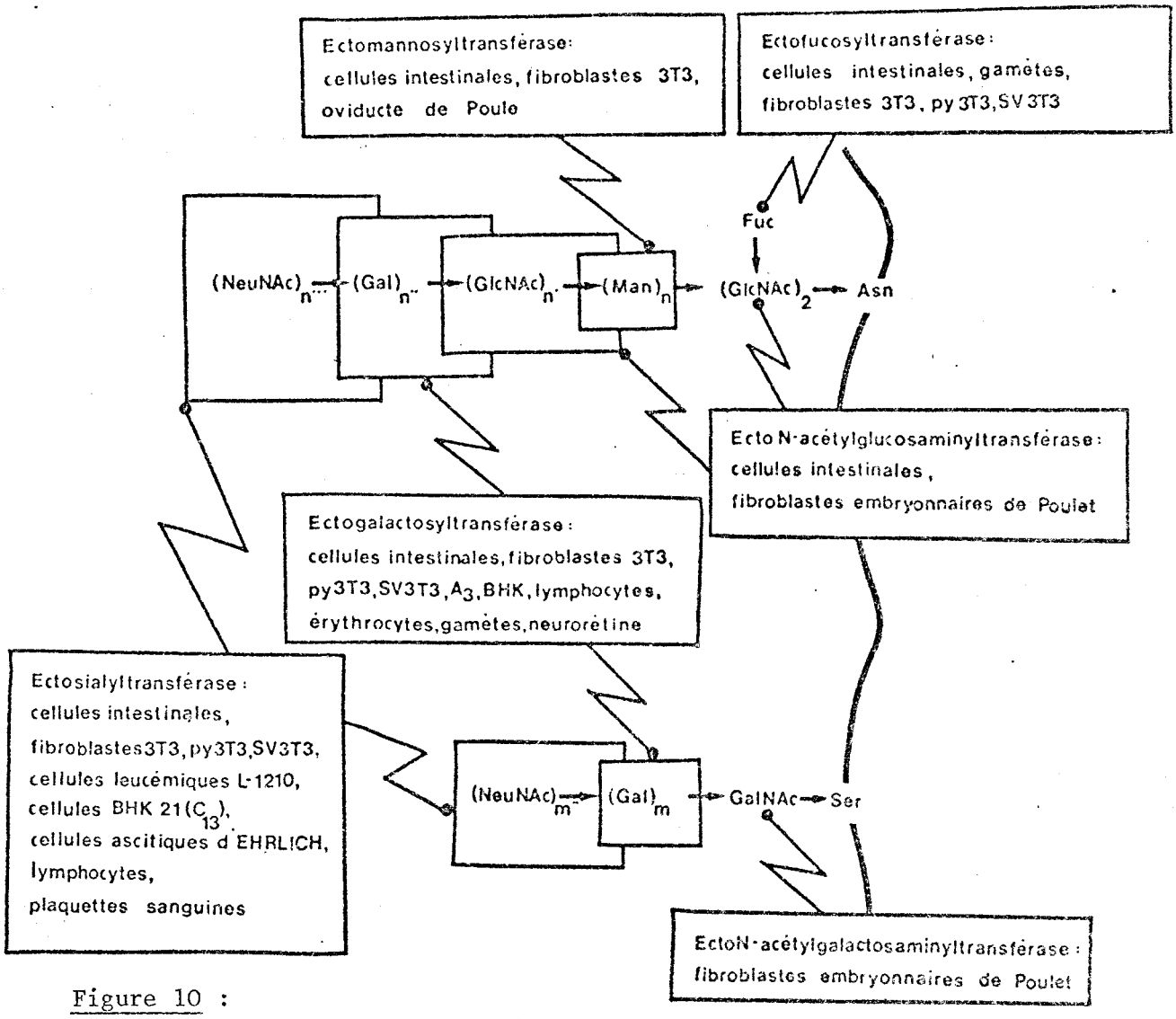


Figure 10 :

Mise en évidence des glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des glycoprotéines à la surface de diverses cellules eucaryotes : cellules intestinales (WEISER : 292 ; ISSELBACHER : 293), fibroblastes 3T3, py 3T3, SV3T3 (PATT et GRIMES : 294), fibroblastes A 31 (PATT et GRIMES : 295), cellules BHK (LAMONT *et al.* : 296 ; DATTA : 297), lymphocytes (LAMONT *et al.* : 298 ; PAINTER et WHITE : 299), cellules leucémiques L (PORTER et BERNACKI : 300), cellules ascitiques d'Ehrlich (CERVEN : 301 ; IRWIN et ANASTASSIADES : 302), plaquettes sanguines (BOSMANN : 303), érythrocytes (PODOLSKY *et al.* : 304), neurorétine embryonnaire de poulet (ROTH *et al.* : 305), gamètes de *Chlamydomonas* (MAC LEAN et BOSMANN : 306), fibroblastes 3T3 (PATT et GRIMES : 307), cellules d'oviducte de Poule (STRUCK et LENNARZ : 308), fibroblastes embryonnaires de Poulet (BOSMANN *et al.* : 309 ; MORGAN et BOSMANN : 310).

3T3 et des fibroblastes transformés (Py 3T3, SV 3T3) par PATT et GRIMES (313). La présence d'ectogalactosyltransférase a été montrée dans les fibroblastes A 31 en culture par PATT et GRIMES (314), dans les cellules 3T3 par PATT *et al.* (315) et dans les cellules BHK par LAMONT *et al.* (316), dans tous ces types cellulaires l'activité augmente fortement pendant la croissance. La présence d'ectogalactosyltransférase à la surface du

lymphocyte a été signalée par LAMONT *et al.* (317), cet enzyme a été également trouvé à la surface des érythrocytes de Lapin par l'équipe d'ISSELBACHER (PODOLSKY *et al.* : 318), à la surface des cellules de neurorétine embryonnaire de Poulet, par ROTH *et al.* (319), et sur les gamètes de *Chlamydomonas* par McLEAN et BOSMANN (320).

L'ectosialyltransférase est la seule ectoglycosyltransférase pour laquelle des preuves ultrastructurales ont été obtenues par PORTER et BERNACKI avec des cellules leucémiques L-1210 (321). Mais il existe également pour cet enzyme des preuves biochimiques de son existence obtenues avec des cellules BHK_{21} (C13) par DATTA (322), des cellules ascitiques d'Ehrlich par CERVÉN (323) et IRWIN et ANASTASSIADES (324), des lymphocytes par PAINTER et WHITE (325), des plaquettes sanguines par BOSMANN (326) et dans ce cas 52 % de l'activité de l'homogenat se retrouve avec une purification de 50 fois dans les membranes plasmiques isolées. Toutefois, le rôle de l'ectosialyltransférase dans la régénération des sialoglycoconjugués de surface dans des lymphoblastes (lignée Raji) semble être négligeable MACA et HAKES (327).

En ce qui concerne l'ectomannosyltransférase PATT et GRIMES l'ont mise en évidence en utilisant des fibroblastes 3T3 (328) et STRUCK et LENNARZ en utilisant des cellules isolées d'oviducte de Poule (329).

La mise en évidence des ecto N-acétylglucosaminyl-et ecto N-acétylgalactosaminyltransférases a été moins largement publiée, mais BOSMANN *et al.* (330) et MORGAN et BOSMANN (331) ont démontré la présence de ces deux enzymes sur la membrane de fibroblastes embryonnaires de Poulet. Une autre difficulté est la mise en évidence de ces enzymes à la surface des cellules. En effet deux types de techniques ont été utilisées pour démontrer sans ambiguité la présence d'ectoglycosyltransférases. La première est l'isolement d'une fraction membranaire enrichie en membranes plasmiques et l'étude de son activité glycosyltransférasique, dans ce cas d'une part l'activité apportée par les membranes intracellulaires contaminantes est loin d'être négligeable, et d'autre part la position externe du site actif de l'enzyme (donc sa nature d'ectoenzyme) ne peut être précisée. La seconde technique est l'utilisation de cellules entières incubées avec le précurseur radioactif avec ou sans accepteur exogène. Cette deuxième technique est couramment employée mais elle est source de nombreuses causes d'erreurs qui ont été signalées par DEPPERT *et al.* (332), KEENAN et MORRE (333) et DEPPERT et WALTER (334). Elles sont au nombre de quatre :

a - La présence d'ectonucléotides-pyrophosphatases et d'ectophosphatases membranaires conduit à la destruction du précurseur selon la

réaction: XDPmonosaccharide $\xrightarrow{\text{Pyrophosphatase}}$ XMP + monosaccharide-1-P $\xrightarrow{\text{Phosphatase}}$ monosaccharide + phosphate. Le monosaccharide radioactif peut pénétrer dans la cellule et la radioactivité mesurée sur les accepteurs endogènes n'est pas une activité de transfert mais une simple entrée de précurseur .

b - Les cellules peuvent secréter des glycosyltransférases dans le milieu d'incubation.

c - Dans le cas d'un accepteur exogène la cellule peut phagocyter l'accepteur et le précurseur. La glycosylation peut alors se dérouler à l'intérieur de la cellule grâce aux glycosyltransférases intracellulaires.

d - Il existe toujours dans une préparation cellulaire quelques pourcents de cellules cassées qui peuvent libérer dans le milieu des enzymes intracellulaires.

Le tableau VI montre de quelles causes d'erreurs les auteurs se sont préoccupés (voir à ce sujet la revue de SHUR et ROTH : 357). On constate qu'aucun auteur ne tient compte de toutes les remarques ce qui rend difficile la comparaison et l'interprétation des résultats.

La dernière objection au rôle des ectoglycosyltransférases dans la biosynthèse est la présence des précurseurs, c'est-à-dire des glycosyl-nucléotides (UDPGal, CMPNeuNAc, GDPFuc, UDPGlcNAc, GDPMan) découverts par LELOIR (CAPUTTO *et al.* : 358) qui sont absents ou en quantité très faible dans les milieux extracellulaires, et qui sont détruits rapidement par les nucléotide -pyrophosphatases membranaires. En fait, ce problème peut être résolu en considérant, d'une part, les concentrations locales sur la membrane qui à proximité de l'enzyme peuvent être élevées

et, d'autre part, la participation des intermédiaires lipidiques de type dolichol phosphate et dont l'importance a été démontrée dans le cas de la biosynthèse des glycoprotéines solubles (voir la revue générale de WAECHTER et LENNARZ: 359). Ces dérivés fortement hydrophobes transportent les sucres activés grâce à une liaison phosphate ou pyrophosphate. En fait, on pense en général à un transport du cytoplasme vers les "citernae" du réticulum endoplasmique. Toutefois, aucune preuve n'a encore été apportée à cette hypothèse et ces molécules pourraient tout aussi bien être des intermédiaires dans la réaction enzymatique.

Ces données ont conduit LENNARZ à proposer en 1975 (360) un schéma de biosynthèse des glycoprotéines membranaires qui utilise ces intermédiaires (voir Fig. 11). Dans ce schéma un oligosaccharide synthétisé dans les membranes est greffé à la protéine membranaire non glycosylée pour donner la

TABLEAU VI

MISE EN EVIDENCE DES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES EN UTILISANT DES CELLULES ENTIERES OU DES MEMBRANES ISOLEES. LES CAUSES D'ERREURS DONT LES AUTEURS ONT TENU COMPTE SONT INDIQUEES PAR DES SIGNES +

		MISE EN ÉVIDENCE EN UTILISANT DES CELLULES ENTIÈRES					
TYPE DE CELLULE	ECTOGLYCOSYL TRANSFÉRASES ÉTUDIÉES	AUTEURS ET RÉFÉRENCES	ENTRÉE DU PRÉCURSEUR	LIBÉRATION DE GLYCOSYLTRANSFÉRASES INTRACELLULAIRES	PHAGOCYTOSE	CELLULES CASSÉES	MISE EN ÉVIDENCE SUR LES MEMBRANES ISOLÉES
PLAQUETTES SANGUINES	GLUCOSYL-	BOSMANN (335)					+
	GALACTOSYL-	BARBER ET JAMIESSON (336)					+
	STALYL-	BOSMANN (337)					+
CELLULES INTESTINALES	FUCOSYL-	MEISER (338) ET ISSELBACHER (339)	+	+			+
	MANNOSYL-		+	+			+
	N-ACÉTYLGLUCOSAMINYL-		+	+			+
	GALACTOSYL-		+	+			+
	GLUCOSYL-		+	+			+
	STALYL-		+	+			+
HÉPATOCYTE DE RAT ADULTE	STALYL-	PRICER ET ASHWELL (340)					+
	GALACTOSYL-	APONSON ET AL. (341)					
ERYTHROCYTE DE LAPIN	GALACTOSYL-	PODOLSKY ET AL. (342)					+
NEURORÉTINE EMBRYONNAIRE DE POULET	GALACTOSYL-	ROTH ET AL. (343)	+	+			
AMIBE	GLUCOSYL-	HOOVER (344)					
	GALACTOSYL-						
HÉPATOCYTE FOETAL	MANNOSYL-	ARNOLD ET AL. (345)	+				
GAMÈTE DE CHLAMYDOMONAS	GALACTOSYL-	McLEAN ET BOSMANN (346)					+
	GLUCOSYL-						+
	N-ACÉTYLGLUCOSAMINYL-						+
	STALYL-						+
	MANNOSYL-						+
	FUCOSYL-						+
CELLULES HELA	GLUCOSYL-	HAGOPIAN ET AL. (347)					+
FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE POULET	GALACTOSYL-	BOSMANN ET AL. (348)					
	MANNOSYL-						
	GLUCOSYL-						
	N-ACÉTYLGLUCOSAMINYL-	MORGAN ET					
	N-ACÉTYLGALACTOSAMINYL-	BOSMANN (349)					
	STALYL-						
CELLULES BHK	STALYL-	SASAKI ET ROBBINS (350)	+				
FIBROBLASTES DE SOURIS 313	STALYL-	PATT ET GRIMES (351)	+	+			
	GALACTOSYL-		+	+			
	N-ACÉTYLGALACTOSAMINYL-		+	+			
	N-ACÉTYLGLUCOSAMINYL-		+	+			
	GLUCOSYL-		+	+			
	MANNOSYL-		+	+			
CELLULES D'OVIDUCTE DE POULE	MANNOSYL-	STRUCK ET LENNARZ (352)	+	+		+	
CELLULES DE HAMSTER BHK ET NIL	GLYCOLIPIDE-GLYCOSYLTRANSFÉRASES	YOGEESWARAN LATTE ET HAKOMORI (353)			+		
	STALYL-				+		
	GALACTOSYL-				+		
	N-ACETYLGALACTOSAMINYL-						
CELLULES ASCITIQUES D'EHRLICH	GALACTOSYL-	MOLNAR ET AL. (354)					+
	N-ACÉTYLHEXOSAMINYL-						+
	STALYL-	IRWIN ET ANASTASIADES (355) CERSEN (356)	+		+		

BIB LILLE

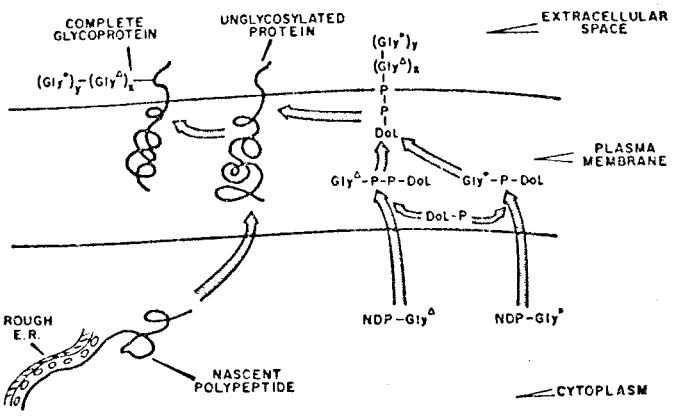


Figure 11 :

Modèle de glycosylation des glycoprotéines de la membrane plasmique via les intermédiaires lipidiques (d'après LENNARZ : 361).
Gly$^{\Delta}$ et Gly* représentent deux résidus glycosidiques différents.

glycoprotéine. Ce schéma a été confirmé en utilisant des cellules isolées d'oviducte de Poule. Avec ce modèle, STRUCK et LENNARZ(362) ont montré dans la membrane plasmique la présence d'ectoenzymes capables de catalyser, à partir de GDP-Man, la suite de réactions :

GDP-Man → Mannosylphosphoryldolichol → Oligosaccharide - lipide → glycoprotéine.

L'utilisation de l'UDP [^{14}C] -GlcNAc a permis à CHEN et LENNARZ (363) de préciser la séquence de réactions de la figure 12. La formation du trisaccharide lié au dolichol :

β-Man → β-GlcNAc → α-GlcNAc → P-P-Dol, est fortement stimulée par la bacitracine. Un autre antibiotique, la tunicamycine, bloque la formation de GlcNAc → P-P-Dol comme l'ont montré STRUCK et LENNARZ (365), mais respecte la formation de mannosylphosphoryldolichol. Enfin, récemment, la première étape de la réaction :

$$\text{UDP-GlcNAc} \xrightarrow[\text{Dol-P}]{\text{Tunicamycine}} \text{GlcNAc} \rightarrow \text{P-PDol} \xrightarrow[\text{UDP-GlNAc}]{} \text{GlcNAc} \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{P-P-Dol}$$

a été démontrée au niveau de ces mêmes membranes par CHEN et LENNARZ (366).

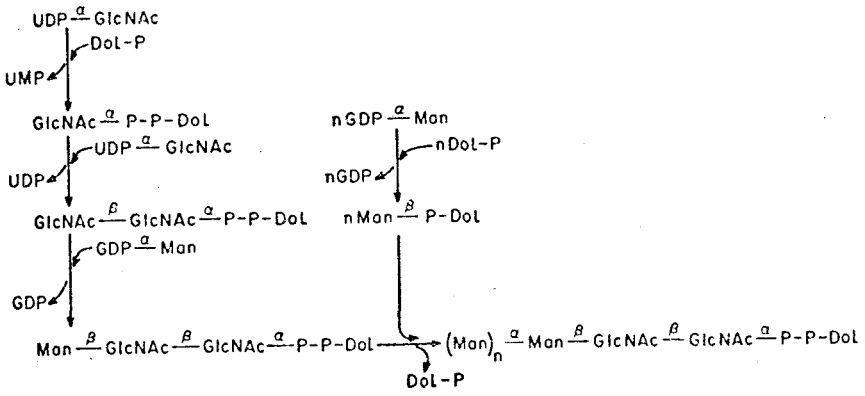


Figure 12 :

Séquence des réactions conduisant à la biosynthèse des glycoprotéines de membrane des cellules d'oviducte de Poule, selon l'hypothèse de CHEN et LENNARZ (364).

La réaction de transfert de l'oligosaccharide sur la protéine nécessite la présence de la séquence tripeptidique Asn-X-Ser (ou Thr) mais aussi un déploiement de la chaîne polypeptidique (voir PLESS et LENNARZ : 367 et RONIN *et al.* : 368).

III - LE CATABOLISME DES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE

La présence d'ectoglycosidases qui seraient capables de dégrader des glycoconjugués membranaires est encore incertaine. Seules des activités ectosialidasique , β-galactosidasique et β-N-acétylglucosaminidasique ont été trouvées dans les membranes plasmiques.

Une sialidase capable d'agir sur les gangliosides copurifie avec la 5'nucléotidase dans l'hépatocyte de Rat (VISSER et EMMELOT : 369 ; SCHENGRUND *et al.* : 370), et dans les synaptosomes (YOHE et ROSENBERG : 371), mais ces études réalisées sur des membranes isolées ne permettent pas

de déterminer l'orientation du site actif de l'enzyme. Aucune activité sialidasique n'a été décelée dans les cellules embryonnaires de Hamster (HEF) ou dans les cellules BHK normales. Par contre, une activité sialidasique apparaît dans ces cellules après transformation spontanée ou virale par l'adénovirus 12 (SCHENGRUND *et al.* : 372). Une activité ectosialidasique est retrouvée dans les fibroblastes d'embryon de Hamster transformés par le virus *Herpex simplex* (type 2) (SCHENGRUND *et al.* : 373). Toutefois, en utilisant des substrats radioactifs comme le $[^{14}C]GM_3$ ou le $[^{14}C]$GD1a aucune activité ne peut être décelée à la surface des cellules Hela dans des conditions de pH physiologique (TALLMAN *et al.* : 374).

Une β-galactosidase a été décrite dans les membranes hépatocytaires du Boeuf (FLEISCHER et FLEISCHER : 375) mais le substrat employé, l'UDP-Gal, permet plutôt la mesure d'une activité pyrophosphatasique qu'une activité galactosidasique. En outre, une β-N-acétylglucosaminidase a été trouvée dans des membranes purifiées des cellules ascitiques d'Ehrlich par MOLNAR *et al.* (376). Comme dans le cas des ectoglycosyltransférases, la diversité des modèles et des techniques mises en oeuvre ne permet pas de définir des règles générales.

CONCLUSIONS

Ces généralités sur la biologie moléculaire des glycoconjugués de surface permettent de dégager deux faits principaux :

1 - Les glycannes des glycoconjugués membranaires jouent un rôle biologique extrêmement important, et ceci grâce à deux caractéristiques leur diversité structurale et leur mode d'intégration dans la membrane.

2 - Ce sont les sucres terminaux qui jouent le rôle de signal de reconnaissance. En effet un résidu galactosyl terminal porté par un glycolipide ou une glycoprotéine membranaire peut faire partie d'un déterminant antigénique, et par là être reconnu par un anticorps ou un lymphocyte. Il faut noter également que lorsque les sucres sont impliqués dans la reconnaissance cellulaire c'est le résidu galactosyl qui semble jouer le rôle important. L'acide N-acétylneuraminique est lui aussi souvent impliqué dans ces phénomènes, il est en effet reconnu par les virus, certaines toxines bactériennes et certaines hormones. De plus le degré de sialylation de la membrane joue un rôle moins spécifique en réglant certaines fonctions vitales comme la perméabilité de la membrane, l'activité des enzymes membranaires et la durée de vie de certaines cellules. Les résidus fucosyl en plus de leur rôle de déterminants antigéniques sont des signaux de reconnaissance pour certains médiateurs.

Les molécules soumises aux agressions du milieu extracellulaire se dégradent rapidement et sont constamment renouvelées par la cellule. Ce problème de la biosynthèse est loin d'être résolu et nous avons vu que deux théories s'affrontent : celle de la biosynthèse par les glycosyltransférases intracellulaires : hypothèse du "membrane flow", et celle de la synthèse par les ectoglycosyltransférases. En fait quelle que soit la localisation de ces enzymes, le schéma de synthèse est identique. La figure 13 résume nos connaissances sur ce sujet dans le cas des glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique. Là encore deux faits se dégagent :

1 - La synthèse du noyau pentasaccharidique interne se fait grâce aux intermédiaires lipidiques (cycle des dolichols) suivie par une maturation du glycanne (étapes 1-4).

2 - Après branchement des résidus N-acétylglucosaminyl (étapes 5 et 7), les résidus terminaux viennent compléter la molécule : addition de résidus fucosyl (étapes 8, 11 et 12), de résidus galactosyl (étape 9) et

Figure 13 :

Schéma hypothétique de la biosynthèse des glycoprotéines membranaires de type N-acétyllactosaminique d'après SCHACHTER (377).

① - Début de la synthèse de la chaîne peptidique. Une séquence N-terminale reconnaît des sites récepteurs du réticulum endoplasmique rugueux. La formation d'un canal transmembranaire permet le passage du peptide naissant au travers de la membrane : BLOBEL et DOBBERSTEIN (378, 379).

② - Synthèse du noyau oligosaccharidique interne grâce au cycle des dolichols : voir les revues générales de HEMMING (380, 381) et de WAECHTER et LENNARZ (382).

③ - Glycosylation du peptide au niveau de l'asparagine : voir JAMIESON (383) et KIELY *et al.* (384).

④ - Maturation du glycanne (élimination des résidus glucosyls et mannosyls excédentaires : voir la revue de ROBBINS *et al.* (385), et les travaux de TABAS *et al.* (386), HUNT *et al.* (387) et CHEN et LENNARZ (388, 389).

⑤ - Action de la β-2-N-acétylglucosaminyltransférase I : voir STANLEY *et al.* (390).

⑥ - Action d'une α mannosidase golgienne. Cette étape est hypothétique mais elle est appuyée par la découverte de cet enzyme par DEWALD et TOUSTER (391).

⑦ - Action de la β-2-N-acétylglucosaminyltransférase II : voir NARASIMHAM *et al.* (392) avant ou après branchement du résidu fucosyl.

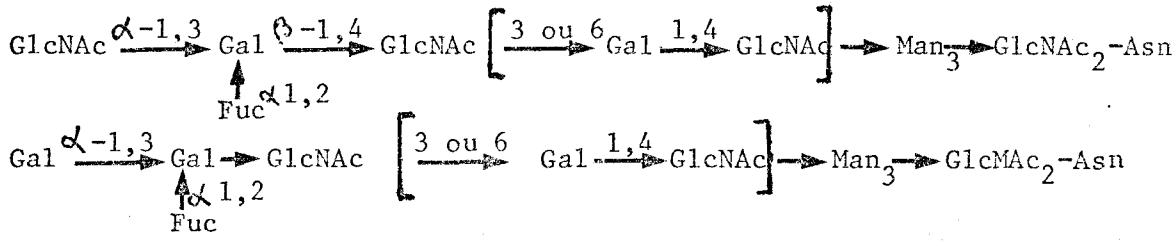
⑧ - Action de l'α-6-fucosyltransférase qui branche un résidu fucosyl sur la N-acétylglucosamine du point d'attache : voir WILSON *et al.* (393) et JABBAL et SCHACHTER (394).

⑨ - Action d'une β-4-galactosyltransférase (KHATRA *et al.* : 395).

⑩ - Action d'une α-6-sialyltransférase : BARTHOLOMEW *et al.* (396), et PAULSON *et al.* (397, 398).

(ou) ⑪ - Action d'une α-3-fucosyltransférase : PAULSON *et al.* (399).

(ou) ⑫ - Action d'une fucosyltransférase branchant un résidu fucosyl sur le galactose. Cette activité n'a pu être décelée que *in vitro* : voir WILSON *et al.* (400), la seule structure correspondant à cette activité connue à ce jour est celle trouvée par KRUSIUS *et al.* (401) sur les N-glycoprotéines de membrane érythrocytaire :



⑬ - Intégration dans la membrane plasmique par fusion de la vésicule golgienne.

résidus sialyl (étape 10).

Le problème posé est donc celui-ci : existe-t-il sur la membrane cellulaire des glycosyl-transférases capables d'achever, ou de réparer les glycoconjugués de surface lors de leur intégration dans la membrane ? par leur activité ces enzymes sont-ils capables de moduler le taux de résidus galactosyl-, sialyl et fucosyl c'est-à-dire de moduler "la quantité de signaux de reconnaissance".

TRAVAUX PERSONNELS

I - LE CHOIX DE LA CELLULE ET DES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES

Deux stratégies de recherches peuvent être employées pour étudier les ectoglycosyltransférases : soit la recherche de ces enzymes dans les membranes plasmiques isolées, ou leur détection sur des cellules entières. La première méthode se heurte à deux objections graves : d'une part, aucune méthode de préparation ne donne une fraction membranaire pure (sauf pour le globule rouge), celle-ci est la plupart du temps contaminée par des membranes intracellulaires en particulier des membranes golgiennes qui sont elles-mêmes riches en glycosyltransférases (galactosyl-sialyl- et fucosyltransférases), d'autre part, la présence d'une activité enzymatique dans une fraction membranaire supposée pure ne permet pas de conclure à la présence d'ectoenzymes car, dans ce cas le substrat est accessible à la fois aux enzymes dont le site actif est dirigé vers le côté intracellulaire et à ceux dont le site actif est dirigé vers le côté extracellulaire.

Pour éviter ces causes d'erreurs nous nous sommes dirigés vers la seconde méthode c'est-à-dire : l'emploi de cellules entières. Dans ce cas comme le substrat (nucléotide-sucre) ne pénètre pas dans la cellule, seuls les ectoenzymes sont détectés. Le principe général de la méthode est schématisé dans la figure 14 qui montre la réaction de transfert sur les accepteurs endogènes de la cellule et sur des accepteurs exogènes.

A - PROBLEME DU CHOIX DE LA CELLULE

L'utilisation de cellules entières pose le problème du choix de la cellule d'expérience. Le choix dépend de deux critères principaux :

1 - les activités détectées étant faibles, il est nécessaire de travailler avec des concentrations en cellules relativement élevées (de l'ordre de 10^8 cellules/ml), il faut donc une souche de cellules qui s'obtient facilement avec un rendement élevé.

2 - les ectoglycosyltransférases étant par définition exposées à la surface externe des cellules, il faut éviter tout traitement qui pourrait faire disparaître ou modifier cette activité. Il faut donc exclure toutes les cellules qui sont cultivées en monocouche sur un support de verre ou de plastique et qu'il faut détacher à l'aide de la trypsine ou de l'EDTA. De plus, ces traitements fragilisent les cellules et perméabilisent la membrane aux précurseurs ce qui rend difficile la distinction entre le transfert dû aux ectoenzymes et celui dû aux enzymes intracellulaires (DEPPERT et WALTER : 402).

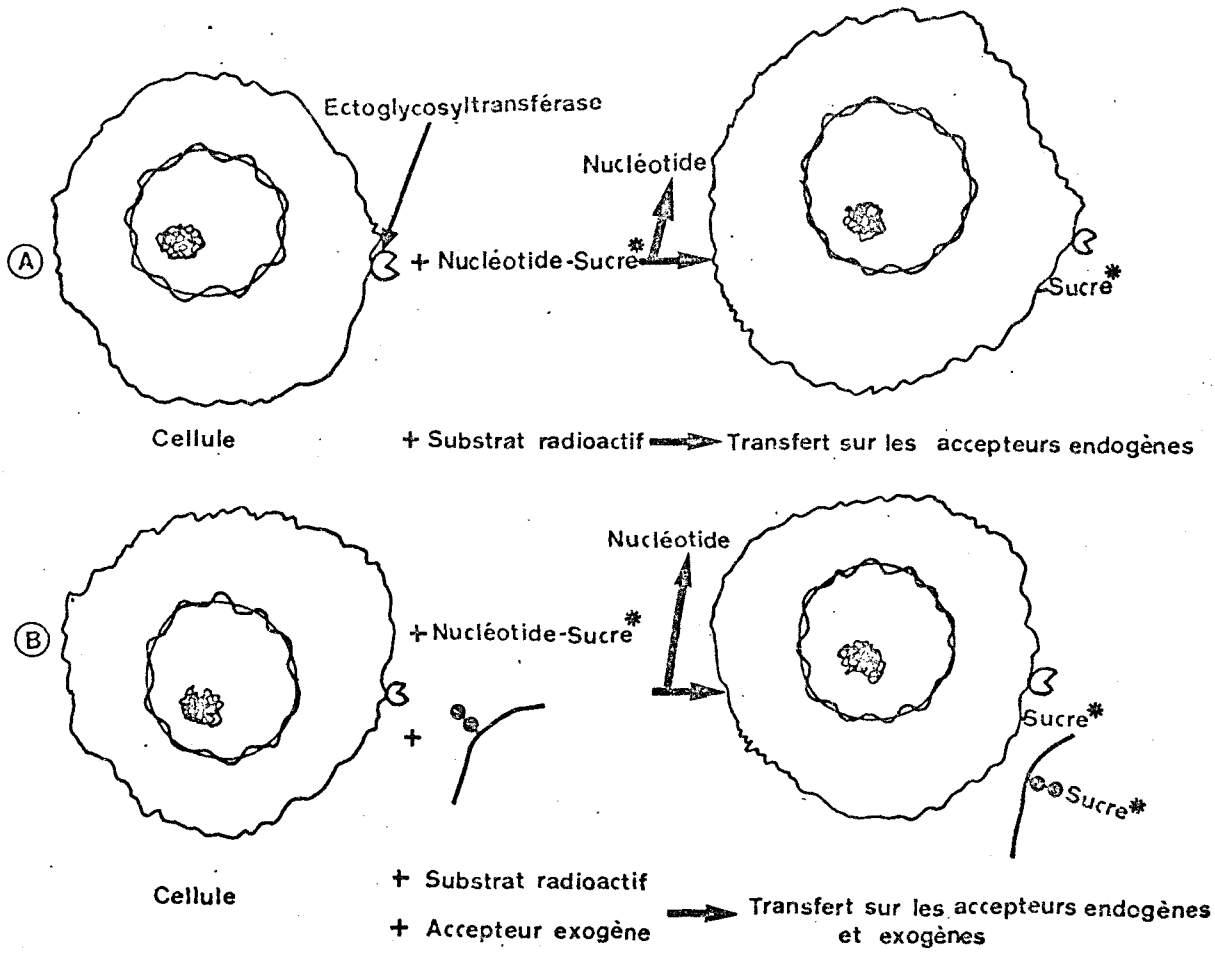


Figure 14 :

Principe général de la méthode de détection des ectoglycosyltransférases en utilisant des cellules entières A) sans accepteur exogène
B) avec accepteur exogène

Une cellule nous a paru répondre à ces deux conditions : le lymphocyte. Dans cette cellule des activités ectogalactosyltransférasiques avaient été trouvées par LAMONT *et al.* (403). L'isolement de lymphocytes spléniques de Rat ne nécessite aucun agent chimique ou enzymatique et consiste en une dissociation mécanique suivie par une hémolyse et par des lavages dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M, Nacl 0,154 M qui est également le tampon d'incubation. Il faut remarquer cependant que la population cellulaire n'est pas homogène et contient à la fois des lymphocytes T et B qui peuvent être différents du point de vue de leurs ectoglycosyltransférases. Cette hétérogénéité, bien qu'elle doit être notée, ne change en rien le problème de la détection.

B - PROBLEME DU CHOIX DES ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES

Il apparaît que ce sont les sucres terminaux (galactose, mannose, acide N-acétylneuraminique, fucose) des glycannes des glycoconjugués membranaires qui jouent le rôle de signal de reconnaissance, ce sont eux

également qui sont transférés en dernier sur la molécule en voie de synthèse. Nous avons choisi d'étudier l'ectogalactosyl, l'ectosialyl et l'ectofucosyltransférase à la surface du lymphocyte.

Le choix de ces trois enzymes pour commencer cette étude simplifie le problème du choix des accepteurs exogènes. En effet les N-acétylglucosaminyl- et mannosyl-transférases agissent principalement au niveau du cycle des dolichols et nécessitent donc comme accepteurs exogènes éventuels des dérivés isopréniques de type dolichol, solubles dans les milieux d'incubations classiques uniquement à l'aide de détergents, ce qui n'est pas réalisable avec des cellules entières.

II - ETUDE DE L'ECTOGALACTOSYLTRANSFERASE

A - ARTICLE I : Nouvelle preuve de l'existence d'une galactosyltransférase à la surface cellulaire

La première étude consiste à retrouver l'activité ectogalactosyltransférasique dans les conditions décrites par d'autres auteurs ce qui permet de se rendre compte de la validité du modèle choisi. Cette première série d'expériences nous a permis de définir les paramètres cinétiques, et les conditions de concentrations en cellules et en accepteur (dans ce cas l'ovomucoïde). Cependant comme l'ont montré KEENAN et MORRE (404) la mesure de l'incorporation d'un sucre radioactif sur des cellules incubées avec un sucre nucléotidique, sans ou en présence d'accepteur exogène peut conduire à des interprétations erronées, en effet :

Objection 1 : nous verrons que l'UDP-Gal utilisé est rapidement dégradé en Gal-1-P puis en Galactose libre qui peut entrer dans la cellule. La radioactivité associée aux cellules peut ne pas être uniquement dûe à la réaction de transfert catalysée par l'ectogalactosyltransférase.

Objection 2 : dans le cas de l'accepteur exogène où la première objection ne peut pas s'appliquer, il peut néanmoins se produire une phagocytose ou une pinocytose de l'accepteur et du précurseur et la glycosylation peut alors être catalysée par les galactosyltransférases intracellulaires. Un processus d'exocytose pourrait rendre l'accepteur "galactosylé" au milieu d'incubation.

Objection 3 : aussi bien pour les accepteurs endogènes que pour les accepteurs exogènes il peut y avoir d'une part, secrétion de glycosyltransférases pendant l'incubation (ce phénomène a d'ailleurs été décrit par LAMONT *et al.* (405) pour les fibroblastes NIL et NILpy), d'autre part il existe inévitablement dans une suspension cellulaire un faible pourcentage de cellules cassées, ces cellules peuvent relacher dans le milieu des membranes intracellulaires contenant des glycosyltransférases et également ces enzymes sous forme soluble. Cette libération d'enzymes dûe à la secrétion ou à la lyse pourrait à elle seule expliquer l'incorporation trouvée.

On s'aperçoit alors que les incorporations obtenues aussi bien sur l'accepteur exogène que sur les cellules, ne permettent pas de conclure à l'existence d'ectogalactosyltransférases si certaines précautions ne sont pas prises.

Pour pouvoir tirer des conclusions quant à la présence de ces enzymes nous avons répondu dans ce premier article à deux de ces trois objections de la manière suivante :

1 - L'utilisation d'un accepteur lié de façon covalente à des billes de Sépharose au moins 10 fois plus grandes que les lymphocytes permet de répondre à l'objection n° 2 et de résoudre le problème posé par les accepteurs exogènes.

2 - L'étude de la répartition de l'activité après l'incubation, entre d'une part le milieu (secrétion) et d'autre part les cellules permet de répondre à l'objection n° 3.

Volume 63, number 1 FEBS LETTERS March 1976

NEW EVIDENCE FOR CELL SURFACE GALACTOSYLTRANSFERASE

René CACAN, André VERBERT and Jean MONTREUIL
Université des Sciences et Techniques de Lille 1, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 B.P. 36, 59650 Villeneuve D'Ascq, France

Received 12 January 1976

1. Introduction

Since Roseman [1] has proposed implications of ectoglycosyltransferase systems in intercellular adhesion and cell recognition, many works tend to demonstrate the occurrence of cell surface glycosyltransferase ([2,7] and for review, see ref. [8]). Except for ectosialyltransferase for which ultrastructural evidence has been obtained [9] the biochemical demonstration for ectoglycosyltransferase is not without certain failure. Recently, Keenan and Morre [10] reviewed the different reasons which can be misleading to conclusive demonstration for the occurrence of this enzymatic system on the outer surface of the plasma membrane. One way to characterize these enzymes is to isolate plasma membranes, however, this approach may be faulty by the contamination with intracellular membrane associated enzymes. Moreover it does not prove the external orientation of the active sites. These are the main reasons why most authors deal with intact cell systems. As it has been pointed out by Keenan and Morre [10], incubation of cells with nucleotide sugars with or without exogenous acceptors leads to the following causes of errors: (i) precursor hydrolysis and entry of the free carbohydrate into the cells, (ii) release or secretion of intracellular glycosyltransferases, (iii) exogenous acceptors glycosylation may be due to phagocytosis or pinocytosis and later excretion in the incubation medium.

Being aware of these facts, we have developed a new methodology to demonstrate clearly the occurrence of ectogalactosyltransferase. The use of acceptors coupled on Sepharose beads far larger in size than the cells allows us to eliminate the third remark. Measurement of the galactosyl transferase activity in the post incubation supernatant medium allows us to answer the second point. Finally, separation of cells from the insoluble acceptors after incubation enables us to discriminate between the glycosylation of the acceptor and the incorporation by the cell.

2. Materials and methods

2.1. *Preparation of cells*

To test the validity of our method we used cells for which ectogalactosyl transferase activities have been mentioned [5] i.e. lymphocytes. Spleen lymphocytes were prepared from three months old Sprague–Dawley rats according to Lamont et al. [5]. Erythrocytes lysis was achieved through a 15 min incubation in 0.154 M ammonium chloride in the presence of 10% fetal calf serum (Novogrodsky, personal communication).

2.2. *Preparation of the acceptor*

According to Spik et al. (unpublished results) ovomucoid is a good galactose acceptor as each of its glycan moieties possesses 5 GlcNAc residues in non-reducing terminal position [11]. Ovomucoid prepared according to Fredericq and Deutsch [12] was coupled to Sepharose 4B by the CNBr method described by March et al. [13]. Fifty miligrams of glycoprotein were fixed per ml of Sepharose beads.

2.3. *Galactosyl transferase assays*

The incubation mixture contained 0.1 M sodium

cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 10 mM $MnCl_2$, 10 μM UDP-[^{14}C]galactose (Amersham, brought to the specific activity of 100 mCi/mM with unlabeled UDP-Gal from Sigma). For a final volume of 50 μl, standard assays contained 6 × 10^6 cells and, either 20 μl of insolubilized acceptor or 300 μg of native ovomucoid. Incubation was achieved at 37°C, with a constant slow rotation of the tube to be sure of a good contact between cells and beads.

2.4. *Separation of cells from acceptors*

When native ovomucoid was used, cells were sedimented by low speed centrifugation. Acceptor containing supernatant was precipitated by the addition of 2 ml of cold 5% phosphotungstic acid in 2 M HCl. The precipitate was collected on a glass fiber filter (Whatman GF/83) and extensively washed with the above phosphotungstic solution and then with cold absolute ethanol. Cells were washed in 0.154 M NaCl, then precipitated and collected as above.

When Sepharose-bound ovomucoid was used, the separation was achieved through adding 200 μl of 40% metrizamide (Nyegaard and Co.) and a further 5 min 5000 *g* centrifugation. In the final 32% metrizamide medium, the floating cells were pipetted, washed in 0.154 M NaCl, precipitated and collected as above. The pelleted beads were washed with 1.5 M NaCl to avoid any radioactive precursor adsorption and collected on glass fiber. They are extensively rinsed with 1.5 M NaCl and then with ethanol. Radioactivity of the collected materials was determined by counting in scintillation liquid.

2.5. *Analysis of nucleotide sugar degradation*

Several authors [14,15] have suggested that cell surface nucleotide pyrophosphatase degrading the sugar nucleotides would prevent the detection of ecto-glycosyltransferase activities. Consequently precursor degradation has been monitored during the incubation period by using paper chromatography developed for 18 h, in the following solvent: ethyl acetate–pyridine–glacial acetic acid–water (5:5:1:3) as recommended by Spik and Six (unpublished results). A strip along the chromatographic path is cut into 1 × 5 cm bands, radioactivity of which was determined by counting in toluol based scintillation medium.

3. Results and discussion

3.1. *Conditions for galactosyltransferase activity with native ovomucoid.*

Preliminary studies and determination of various parameters of the glycosylation process have been realized with native ovomucoid. Fig.1 reports a time-dependent incorporation of galactose both on exogenous ovomucoid and by cells, showing that ovomucoid can be used as an acceptor for the lymphocyte galactosyltransferase system. As shown in fig.2a, optimal galactose transfer on ovomucoid is obtained with a final concentration of 10^8 cells/ml, which is not the case for the galactose incorporated by the cells. These results may be accounted for by the fig.2b: the plateau observed for transfer activity is due to an extensive degradation of UDP-Gal when cell concentration exceeds 10^8 cells/ml. Moreover, similarity is observed between the increasing cell incorporated radioactivity and free galactose formation from UDP-Gal via Gal-1-P. These facts suggest that incorporation by the cells is due, to a certain extent, to galactose entry and its incorporation by the cells. The effect of ovomucoid concentration on the transfer reaction is shown in fig.3: while a plateau is observed from the concentration of 8 mg of ovomucoid per ml, the galactose incorporated by the cells remains

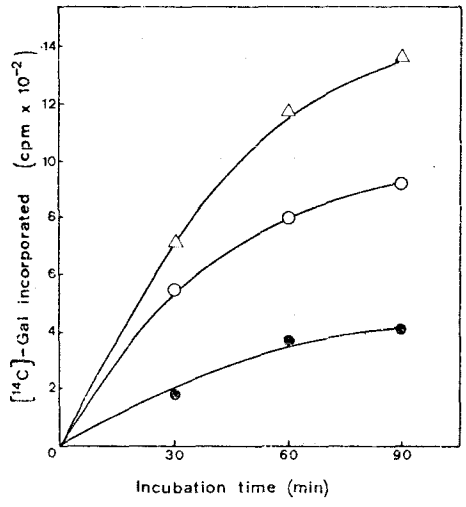


Fig.1. Kinetic study of the incorporation of radioactive galactose on native ovomucoid (●—●), by lymphocytes (○—○) and for total incorporation, cells plus acceptors (△—△). The final cell concentration was 6 × 10^7 cells/ml.

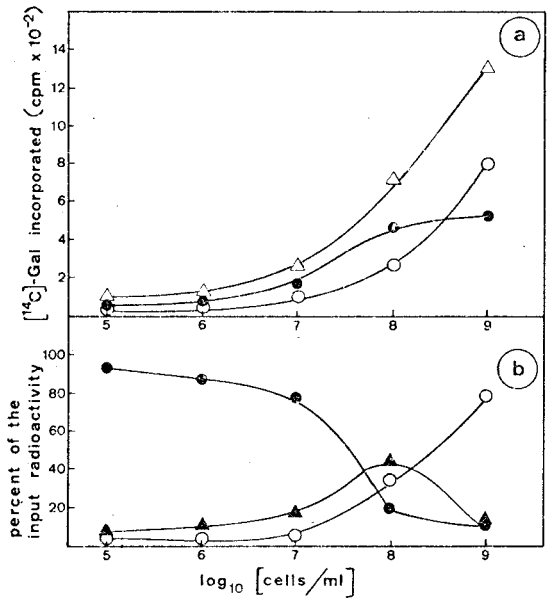


Fig.2(a) Effect of cell concentration on the incorporation of radioactive galactose on native ovomucoid (●—●) by the lymphocytes (○—○) and for total incorporation, cells plus acceptors (△—△). (b) Effect of cell concentration on the UDP-Gal degradation (●—●), free galactose appearance (○—○) and Gal-1-P evolution (▲—▲). Assays were made in the standard conditions for a 60 min incubation time.

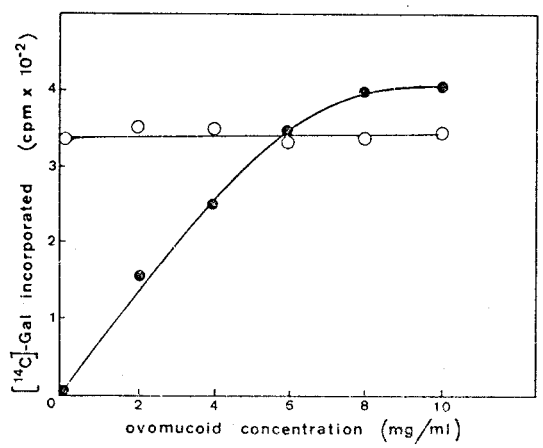


Fig.3. Effect of the native ovomucoid concentration on the incorporation of radioactive galactose on native ovomucoid (●—●), and by the lymphocytes (○—○).

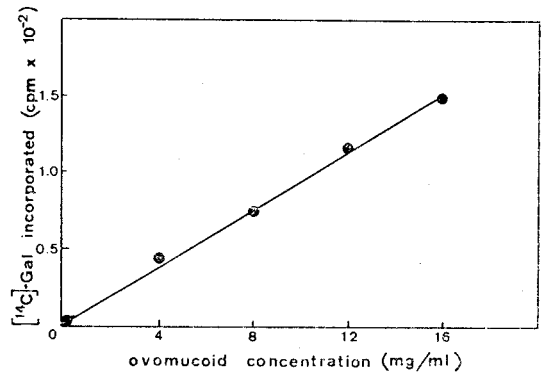


Fig.4. Radioactive galactose transfer reaction measured with increasing amounts of insolubilized ovomucoid. 15 μl of ovomucoid coupled beads represent an acceptor concentration of 4 mg/ml. The cell concentration was 10^8 cells/ml in a final volume of 75 μl. 200 cpm correspond to the transfer of 1 pM of galactose.

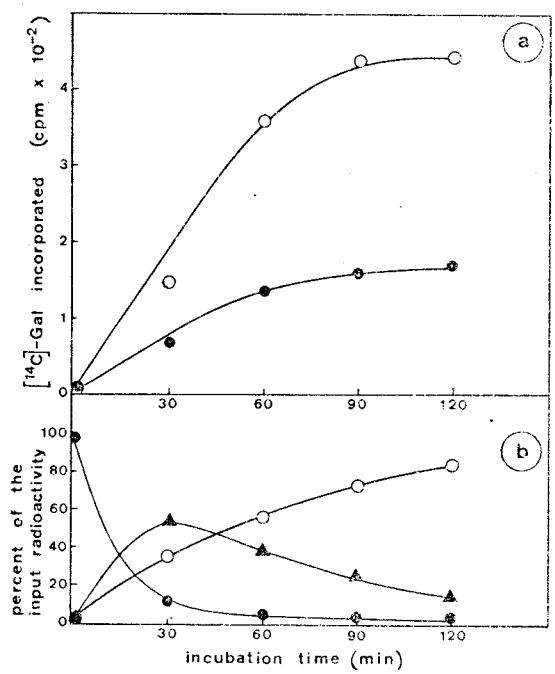


Fig.5(a) Kinetic studies of the incorporation of radioactive galactose on the insolubilized ovomucoid (●—●), by the lymphocytes (○—○). (b) Kinetic studies of the UDP-Gal degradation (●—●), of the free galactose appearance (○—○) and of the Gal-1-P evolution (▲—▲). The cell concentration was 10^8 cells/ml. 20 μl of ovomucoid coupled beads were used in a final volume of 50 μl.

BUS LILLE

constant and is not competed by the transfer reaction, which suggests again two separate phenomena.

The experiments described above are those commonly used by authors, yet, they do not allow any discrimination between intracellular and cell surface glycosyl transferases. Using these precedently determined parameters, we have measured the ability of intact lymphocytes to catalyse the transfer of galactose from UDP-Gal to nonphagocytosable ovomucoid-coupled beads.

3.2. *Ectogalactosyltransferase activity measured with exogenous insolubilized acceptors*

The transfer activity is proportional to the amount of ovomucoid-coupled beads added to the incubate with the cells. In this case, up to 16 mg/ml, no plateau is reached; this can be due to the fact that reaction does not depend on the acceptor concentration but rather on the number of true contacts between cells and beads. The transfer reaction is time-dependent as shown in fig.5. As previously observed, the transfer of galactose on immobilized ovomucoid depends on the UDP-Gal really present during the incubation (i.e. not yet degraded) and the incorporation by the cells follows the free galactose formation.

The zero-time incubation shows that there is no unspecific adsorption of radioactive material on the immobilized ovomucoid. These blank values are also shown in table 1a, where incubation of radioactive UDP-Gal is made either with non-coupled beads and cells or with coupled beads but no cells.

These results show that there is an effective glycosylation outside the cells. Moreover, as shown in table 1b, no detectable incorporation is observed on the insolubilized ovomucoid when incubation is made with the supernatant of the cell plus beads medium before or during incubation. On the contrary, after removing the supernatant, the whole galactosyltransferase activity is recovered within the cell plus beads pellet mixture. These results definitely exclude

Table 1

		Incubation time (min)	Radioactive galactose transferred on ovomucoid coupled beads (cpm)	Radioactive galactose incorporated by the cells (cpm)
(a)	Standard mixture:			
	Complete	60	320	430
	Complete	0	30	30
	Minus cells	60	35	–
	Minus coupled beads, plus uncoupled beads	60	35	410
(b)	Standard cell + beads mixture			
	No preincubation:			
	supernatant activity	60	62	–
	pellet activity	60	353	329
	30 min. preincubation:			
	supernatant activity	60	69	–
	pellet activity	60	330	347
(c)	Standard mixture:			
	no preincubation	60	310	472
	15 min. preincubation	60	362	470
	30 min. preincubation	60	364	504

(a) Evaluation of eventual unspecific adsorption of radioactive precursors on the Sepharose beads.
(b) Studies of an eventual release of intracellular galactosyltransferase by determination of the supernatant activity before (no preincubation) or during (30 min preincubation) the reactime time.
(c) Studies of an eventual release of intracellular galactosyltransferase by adding the radioactive precursor after various preincubation periods.

the possibility of the release of intracellular enzyme before the incubation (cell lysis) or during the incubation (secretion or cell breakage). In addition to this, when radioactive precursor is added after various preincubation time, the transfer activity is not increased in a noticeable proportion (table 1c) showing that no additional galactosyltransferase activity has appeared during the incubation.

4. Conclusions

The methodology described above enables us to prove unambiguously the occurrence of galactosyltransferase on the lymphocyte cell surface. This enzyme is able to transfer galactose from UDP-Gal to an exogenous acceptor. The proofs for the external position of the active site are as follows: (i) a non-phagocytosable exogenous acceptor can be glycosylated, (ii) the separation of cells from the acceptor after the incubation eliminates errors due to incorporation of free carbohydrate by cells, (iii) the glycosylation is not due to a release of intracellular enzymes during incubation. However, it is difficult to associate this ectogalactosyltransferase with membrane protein or lipid glycosylation because we have observed the presence of a very active membranous system degrading UDP-Gal. Nevertheless, our results point out the existence of sites on the cell surface able to recognize terminal GlcNAc residues of the glycan moiety of a glycoprotein.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the C.N.R.S. (L.A. n° 217: Biologie Physico-Chimique et Moléculaire des Glucides Libres et Conjugués and A.T.P. Pharmacodynamie et Chimiothérapie) and by the Commissariat à l'Energie Atomique. We are grateful to Nyegaard and Co for their generous gift of metrizamide.

References

[1] Roseman, S. (1970) Chem. Phys. Lipids, 5, 270–297.
[2] Jamieson, G. A., Urban, C. L. and Barber, A. J. (1971) Nature New Biol. 234, 5–7.
[3] Roth, S., Mc Guire, E. J. and Roseman, S. (1971) J. Cell. Biol. 51, 536–547.
[4] Bosmann, H. B. (1974) Biochim. Biophys. Acta 339, 438–441.
[5] Lamont, J. T., Perroto, J. L., Weiser, M. M. and Isselbacher, K. J. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. US 71, 3726–3730.
[6] Podolsky, D. K. and Weiser, M. M. (1975) Biochem. J. 146, 213–221.
[7] Patt, L. M. and Grimes, W. J. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 483–490.
[8] Shur, B. D. and Roth, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 415, 473–512.
[9] Porter, C. W. and Bernacki, R. J. (1975) Nature 256, 648–650.
[10] Keenan, T. W. and Morré, D. J. (1975) FEBS Lett. 55, 8–43.
[11] Bayard, B. and Montreuil, J. (1974) Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq 20-27 june 1973, CNRS, Paris 1, 209–218.
[12] Fredericq, E. and Deutsch, H. F. (1949) J. Biol. Chem. 181, 499.
[13] March, S. C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149–152.
[14] Webb, G. C. and Roth, S. (1974) J. Cell. Biol. 63, 796–804.
[15] Deppert, W., Werchau, H. and Walter, G. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. US 71, 3068–3072.

B - ARTICLE II : Ectogalactosyltransférase : présence d'enzyme et d'accepteurs à la surface du lymphocyte de Rat

L'emploi d'un accepteur exogène insolubilisé nous permet donc de montrer sans ambiguité l'existence d'une ectogalactosyltransférase à la surface du lymphocyte. Cet enzyme est capable de transférer le galactose de l'UDP-Gal à un accepteur exogène (trans-glycosylation). Les preuves sont les suivantes :

1 - un accepteur exogène non phagocytable peut être "galactosylé"

2 - la séparation des cellules et de l'accepteur permet de connaître indépendamment le transfert sur l'accepteur et la radioactivité liée aux cellules;

3 - la glycosylation n'est pas due à la libération d'enzymes intracellulaires par lyse ou secrétion.

Ce processus de trans-glycosylation est très important, en effet la plupart des études concernant la reconnaissance cellulaire montre l'importance des résidus galactosyl , voir par exemple ROTH *et al.* sur des cellules de neurorétine embryonnaire de Poulet (406) et CHIPOWSKY, LEE et ROSEMAN sur des fibroblastes SV3T3 (407). Ce processus de trans-glycosylation n'est possible que si la cellule possède sur sa membrane des accepteurs pour les ectogalactosyltransférases. Il importait donc de savoir si la radioactivité que nous avions détectée sur les cellules correspondait seulement à une entrée de galactose radioactif, ou si dans cette incorporation une partie résultait d'un transfert de résidus galactosyl sur des accepteurs membranaires.

Dans l'article II nous démontrons qu'en corrigeant les causes d'erreurs dues à l'hydrolyse de l'UDP-Gal et à l'entrée du galactose dans les cellules, il est possible de mettre en évidence à la surface du lymphocyte, une ectogalactosyltransférase dont le site actif est capable de transférer du galactose sur les accepteurs membranaires. Ces conclusions peuvent paraître en contradiction avec celles de PATT *et al.* (408) qui ne détectent pas d'activité ectogalactosyltransférase sur des lymphocytes de Souris. En fait ces auteurs utilisent pour cette étude des lymphocytes stimulés par la concanavaline A, dans lesquels la pénétration et l'utilisation du galactose libre sont supérieures à celles des cellules au repos. D'autre part on sait qu'il se produit lors de la transformation blastique du lymphocyte des remaniements membranaires importants en particulier au niveau des ectoglycosyltransférases comme l'ont montré PAINTER et WHITE (409) pour l'ectosialyltransférase.

D'autre part les expériences utilisant l'agglutinine du Soja

(SBA) comme sonde pour mesurer les modifications de la membrane, montrent que les résidus galactosyl branchés par cet enzyme le sont dans une position externe et qu'ils peuvent se comporter comme des signaux de reconnaissance vis à vis d'une macromolécule externe.

Eur. J. Biochem. 70, 49–53 (1976)

Ectogalactosyltransferase

Presence of Enzyme and Acceptors on the Rat Lymphocyte Cell Surface

André VERBERT, René CACAN, and Jean MONTREUIL

Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique
and Laboratoire associé au Centre National de la Recherche Scientifique no 217, Villeneuve d'Ascq

(Received June 12/August 20, 1976)

Experiments are described to demonstrate the existence of ectogalactosyltransferase activity on the lymphocyte surface. The procedures described enable us to exclude the possibility of misleading results due to precursor hydrolysis and intracellular utilization of the free galactose. This depicted transferase is able to catalyse the transfer of a galactosyl residue from UDP-galactose to a non-phagocytosable exogenous acceptor and to endogenous membrane acceptors. The cells galactosylated in this way acquired new agglutinating properties with soybean agglutinin, which proves the external position of the galactosyl residues incorporated on the cell surface.

Ectoglycosyltransferases are defined as membrane-bound enzymes whose active sites are accessible from the outside of the cell [1]. Their presence is important from several points of view: first, for their possible implication in biosynthesis or repair of the carbohydrate moiety of membrane glycoconjugates [2], secondly, for their assumed role in intercellular adhesion [3] and in glycoprotein [4] or cell recognition [5,6].

During the past few years, biochemical evidence for the surface localization of glycosyltransferases has accumulated (for review see [7]). However, as pointed out by Keenan and Morré [8], this evidence is not necessarily conclusive. In fact, incubation of cells with nucleotide sugars and subsequent incorporation of sugars by cells or onto exogenous acceptor may not indicate the involvement of ectoenzymes: it may be due, on the one hand, to an intracellular utilization of the free sugar after hydrolysis of the precursor or, on the other, to the action of intracellular enzymes either because they have been released into the incubation medium or because the acceptor has been glycosylated within the cell after phagocytosis.

In a previous work [9], we developed a method to eliminate the last two causes of errors by using a non-phagocytosable acceptor and a concomitant measurement of the activity of the post-incubation supernatant medium. This methodology allowed us to bring additional evidence about the presence of galactosyltransferase on the outer cell surface of rat lymphocytes. This paper presents a continuation of this work. We show how to minimize intracellular utilization of free galactose and discriminate it from enzymatic incorporation on the cell surface. We prove the real external position of the newly incorporated galactosyl residues by using the property gained by the lymphocyte membrane to bind soybean agglutinin.

Abbreviation. UDP-Gal, uridine diphosphogalactose.
Enzyme. Neuraminidase (EC 3.2.1.18).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade and all sugars are of the D-configuration. UDP-[^{14}C]Gal (298 Ci/mol) was obtained from the Radiochemical Center Amersham, England) and [^{3}H]potassium borohydride (17.8 Ci/mMol) from the C.E.A. (Saclay, France). Unlabelled UDP-Gal, galactose, UMP and phloridzin were purchased from Sigma (St Louis, U.S.A.). Metrizamide was a gift of Nyegaard and Co. (Oslo, Norway). *Vibrio cholerae* neuraminidase was obtained from Koch-Light Laboratories (Bucks, England).

Preparation of Cells and Acceptors

Spleen lymphocytes were prepared from three-month-old Sprague Dawley rats according to Lamont *et al.* [10]. Soluble and Sepharose-coupled ovomucoid were used as exogenous acceptor as previously described [9].

Standard Galactosyltransferase Assays

The incubation mixture contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 10 mM $MnCl_2$,

10 μM UDP-[^{14}C]Gal (brought to the specific activity of 100 mCi/mM with unlabelled UDP-Gal, *i.e.* an average value of 200 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$). For a final volume of 50 μl, standard assay contained 6×10^6 cells and either 20 μl of insolubilized acceptor containing 50 mg of fixed ovomucoid per ml of Sepharose beads or 300 μg of native ovomucoid. Incubation time and temperature are defined for each set of experiments in the legends to figures. As previously described [9], after incubation cells are separated from exogenous acceptor either by low-speed centrifugation when native ovomucoid was used or in 32% metrizamide medium centrifugation when Sepharose-bound ovomucoid was the acceptor. Acid-precipitable and insoluble materials are collected and washed on glass fiber filter (Whatman GF 83), then radioactivity was determined by counting in scintillation liquid.

Analysis of Nucleotide Sugar Degradation

Precursor degradation was monitored during the incubation period by paper chromatography as already mentioned [9].

Preparation of Labelled Soybean Agglutinin

Soybean agglutinin was prepared from soybean meal by affinity chromatography according to the procedure described by Gordon *et al.* [11]. Labelling of soybean agglutinin has been achieved by short periodic acid oxidation of the mannose residues and further reduction with tritiated potassium borohydride [12]. This method afforded a radioactive product (specific radioactivity was around 600 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) which retained full hemagglutinating activity.

Agglutination and Cell Binding of Labelled Soybean Agglutinin

Cell agglutination assays were performed in plastic trays with 6-mm wells. Cells (2×10^7 cells/ml) and serial dilutions of soybean agglutinin (from 2–250 μg/ml) in cacodylate/NaCl buffer were added to each well in a final volume of 100 μl. Agglutination was allowed to develop for 1 h at room temperature and was scored by counting residual non-agglutinated cells under light microscope.

For quantitative labelling, cells (2×10^7 cells/ml) were incubated in plastic tubes for 15 min at 20 °C with various concentrations of tritiated soybean agglutinin in a final volume of 500 μl per assay. After incubation, cells were washed twice by centrifugation. The final pellet was resuspended and rinsed once more on glass fiber filter. After drying, the radioactivity of the retained material was counted in scintillation liquid.

Cell Surface Treatment Before Soybean Agglutinin Agglutination or Binding Studies

Incorporation of galactosyl residues on the cell surface acceptors was performed at 30 °C, during 1 h in the standard assay buffer, but UDP-Gal was used at the final concentration of 200 μM and UDP-[^{14}C]Gal was omitted. 1 mM UMP was added to the medium to prevent UDP-Gal degradation (see Results). Control cells were incubated in the same condition except for the presence of UDP-Gal.

For neuraminidase treatment, cells were suspended at a final concentration of 10^8 cells/ml in 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 0.1% $CaCl_2$ with 5 units/ml of *V. cholerae* neuraminidase and incubated during 1 h at 37 °C. After enzyme treatments, cells were washed twice by centrifugation and resuspended in the cacodylate/NaCl buffer.

RESULTS AND DISCUSSION

In our previous work [9], we demonstrated the occurrence of galactosyltransferase activity on the lymphocyte outer cell membrane. The enzyme is able to transfer galactose to a non-phagocytosable exogenous acceptor. However, owing to the presence of very active membranous nucleotide pyrophosphatase(s) and phosphatase(s) hydrolyzing UDP-Gal to galactose 1-phosphate then to galactose [13], we were not able to distinguish whether the radioactivity incorporated by the cells was, in fact, due to entry of free galactose into the cells or to a real enzymatic galactosylation of the plasma membrane acceptors. To discriminate between these two possibilities we developed a set of experiments to inhibit the action of pyrophosphatases.

Ectogalactosyltransferase Activity in the Presence of UMP

It has been reported that nucleoside 5′-monophosphates are potent inhibitor of the nucleotide sugar hydrolysis [14]. Fig. 1B shows that 5′-UMP is an effective inhibitor of the lymphocyte plasma membrane nucleotide pyrophosphatase: UDP-Gal is already protected in the presence of 0.5 mM UMP but protection is complete with concentration above 2.5 mM. However, UMP concentrations higher than 2 mM inhibit the transferase activity as shown on Fig. 1A by the measurement of the galactose incorporated on the insolubilized exogenous acceptor. In addition, Fig. 1B reveals that the cells still incorporated radioactive galactose even when no free galactose was released. These results let us presume that entry of radioactive galactose could not fully explain the radioactivity recovered with the cells in the standard assays. 1 mM UMP appears to be the optimal concentration

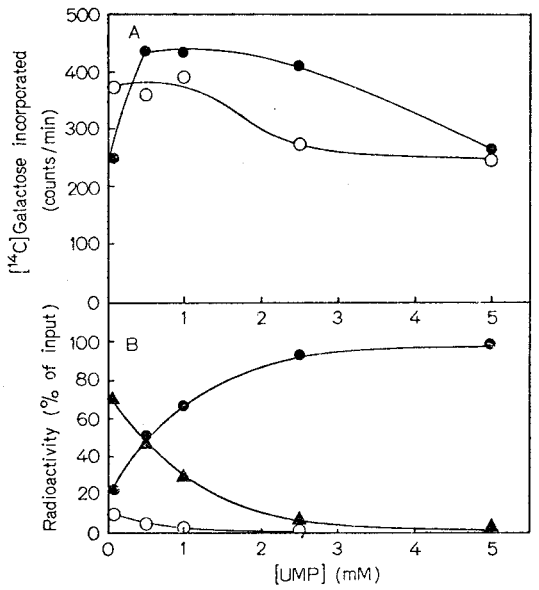


Fig. 1. *Effect of various concentrations of UMP on the transfer activity (A) and on the UDP-Gal degradation (B).* Incubations were performed in the standard conditions at 37 °C for 45 min with a final concentration of cells of 1.2×10^8 cells/ml, 20 µl of immobilized ovomucoid was used as acceptor in a final volume of 50 µl in the cacodylate/NaCl/$MnCl_2$ buffer, pH 7.4.(A) Effect of UMP on the incorporation of radioactive galactose on insolubilized ovomucoid (●——●) and by the cells (○——○). (B) Effect of UMP on the UDP-Gal integrity (●——●), free galactose (○——○) and galactose 1-phosphate (▲——▲) appearance

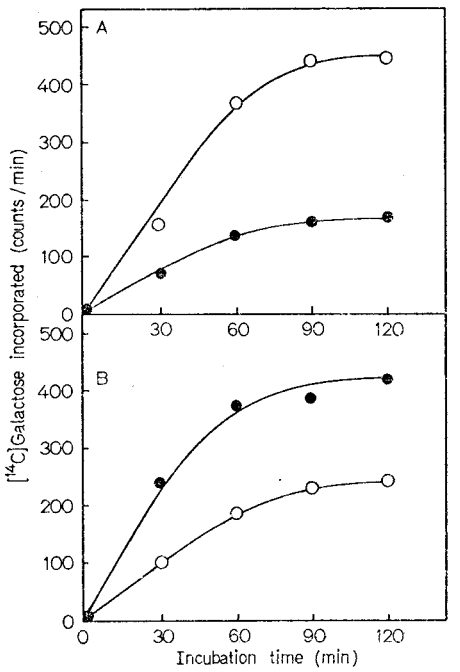


Fig. 2. *Kinetic studies of the incorporation of radioactive galactose.* Incubations were performed in the standard conditions at 37 °C with a final concentration of cells of 1.5×10^8 cells/ml, 20 µl of immobilized ovomucoid was used as acceptor in a final volume of 50 µl in the cacodylate/NaCl/$MnCl_2$ buffer, pH 7.4. (A) Incorporation of radioactive galactose on insolubilized ovomucoid (●——●) and by the cells (○——○) was measured in the absence of UMP. (B) Incorporation of radioactive galactose on insolubilized ovomucoid (●——●) and by the cells (○——○) was measured in the presence of 1 mM UMP

for sufficient protection of UDP-Gal without inhibition of the transferase activity. Kinetic studies without UMP (Fig. 2A) or with 1 mM UMP (Fig. 2B) show that the transfer activity on the immobilized exogenous acceptor is increased in the presence of 1 mM UMP, because the precursor concentration is kept at a higher level during the incubation. Moreover, radioactivity of cells decreases to a certain extent in the presence of UMP, showing that part of the latter is due to entry of free galactose. This fact has been recently pointed out by Patt *et al.* [15] with mouse lymphocytes stimulated with concanavalin A.

Temperature Effect on the Ectogalactosyltransferase Activity

Fig. 1B shows that 1 mM UMP is not sufficient to inhibit completely free galactose formation; subsequently we checked the temperature dependency of this phenomenon in relation to the transferase activity. Fig. 3B shows that UDP-Gal degradation during the 1 h incubation period increased with temperature but free galactose only appears above 20 °C because the first step of its formation is the appearance of galactose 1-phosphate. On the one hand, above

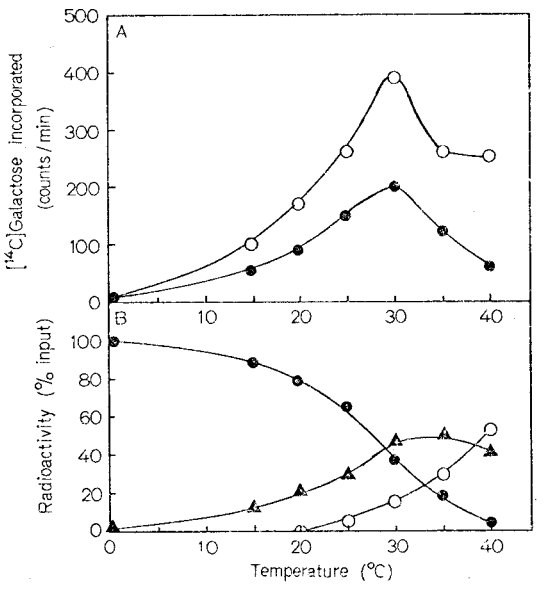


Fig. 3. *Temperature dependence of the incorporation of radioactive galactose and of the UDP-Gal degradation.* Incubations were performed in the standard conditions for 1 h with a final concentration of cells of 2×10^8 ml with 10 mg/ml of insolubilized ovomucoid in a final volume of 100 µl, in the cacodylate/NaCl/$MnCl_2$ buffer, pH 7.4. (A) Incorporation of radioactive galactose on ovomucoid (●——●) and by the cells (○——○). (B) UDP-Gal integrity (●——●), galactose 1-phosphate (▲——▲) and free galactose (○——○) appearance

20 °C free galactose formation increases with temperature while radioactivity incorporated by the cells shows a maximum at 30 °C; this induces us to suppose two separate phenomena. On the other, the incorporation of galactosyl residues into ovomucoid and by the cells exhibits the same optimal temperature due to an extensive degradation of UDP-Gal at temperatures higher than 30 °C. This fact may be accounted for by a direct transfer of galactose from UDP-Gal to cell membrane acceptors.

Inhibition of the Entry of Free Galactose

The above given data determine new conditions (1 mM UMP, 25 °C) to minimize galactose appearance in the incubation medium. Addition of phloridzin together with an excess of unlabelled galactose allows us to abolish any entry of the residual radioactive galactose [13]. A final concentration of 5 mM phloridzin and 1 mM galactose has been shown to reduce the entry of galactose to less than 0.1 % of the extracellular radioactive galactose in our incubation conditions, without affecting the galactosyltransferase activity. We thus defined new incubation conditions (1 mM UMP, 25 °C, 5 mM phloridzin, 1 mM galactose) to be used when one wants to decide whether the radioactivity recovered with the cells from UDP-[^{14}C]Gal is in fact incorporated into the cell from free galactose or whether it is incorporated on the outer cell surface as a result of galactosyltransferase activity. Using these conditions, we measured the incorporation of galactosyl residues on the cell surface with increasing concentrations of cells. Fig. 4 shows that the phenomenon is dependent on the presence of UDP-Gal as indicated by the fact that higher incorporation cannot be obtained when cell concentration exceeds 5×10^8 cell/ml because of the total degradation of the precursor during the incubation period, and as revealed by its independence of galactose formation.

Demonstration of the Outer Position of the Cell Membrane Incorporated Galactose

The first series of experiments demonstrated that transfer of radioactive galactose on the cell surface acceptors was effectively performed by ectogalactosyltransferase. As the specific radioactivity of the UDP-[^{14}C]Gal was 200 counts $\times$ min^{-1} $\times$ pmol^{-1} we evaluated the number of newly appeared external galactosyl residues as being at least 3×10^4 per cell. It has been shown that the minimal number of receptors required for agglutination to take place with antibodies [16] or lectins (Sharon, personal communication) is around 2×10^4 per cell. Therefore, spleen lymphocytes should acquire new agglutinating properties with soybean agglutinin after endogenous galactosylation of their outer cell surface.

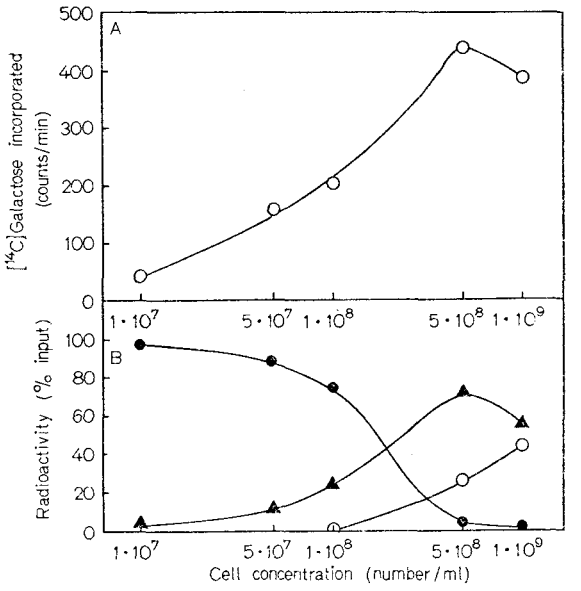


Fig. 4. *Effect of cell concentration on the incorporation of radioactive galactose on the cells and concomitant analysis of UDP-Gal degradation.* Incubations were performed at 25 °C during 1 h in the cacodylate/NaCl/$MnCl_2$ buffer, pH 7.4, containing 1 mM UMP, 5 mM phloridzin and 1 mM galactose. Logarithmic scale is used to represent the cell concentration. (A) Incorporation of radioactive galactose on the cells (○——○). (B) UDP-Gal integrity (●——●), galactose 1-phosphate (▲——▲) and free galactose (○——○) appearance

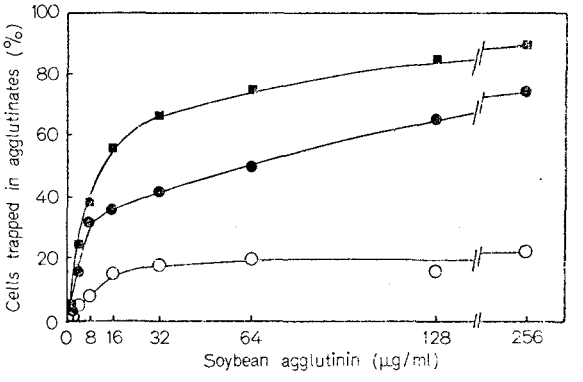


Fig. 5. *Agglutination of lymphocytes at different soybean agglutinin concentrations.* Agglutination assays were performed with 2×10^7 cells per ml in a final volume of 100 µl of cacodylate NaCl buffer, pH 7.4. Percent of normal lymphocytes (○——○), galactosylated cells (●——●) and neuraminidase-treated cells (■——■) trapped in agglutinates were scored by counting residual non-agglutinated cells

Fig. 5 represents the differential lectin agglutination of non-treated, neuraminidase-treated, and galactosylated lymphocytes. As already described [17] normal lymphocytes slightly agglutinate with soybean agglutinin but when terminal galactosyl residues are unmasked by the action of neuraminidase they exhibit enhanced agglutinating properties with soybean agglutinin [18]. In our experiments, when newly exposed galactosyl residues are brought by the action

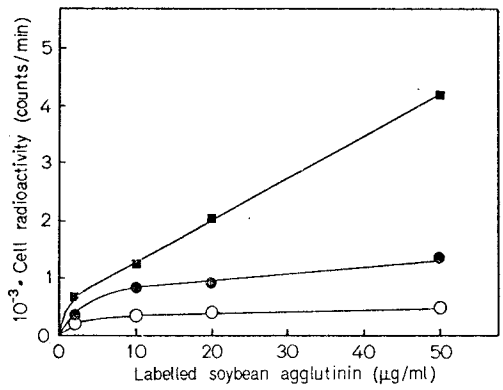


Fig. 6. *Binding of labelled soybean agglutinin to lymphocytes.* Binding assays were performed with tritiated soybean agglutinin (specific radioactivity 600 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) in 500 µl cacodylate/NaCl buffer, pH 7.4, with a final cell concentration of 2×10^7 per ml, for 15 min at 20 °C. Increasing amounts of soybean agglutinin were added to normal lymphocytes (○——○), galactosylated cells (●——●) and desialylated cells (■——■)

of ectogalactosyltransferase, galactosylated lymphocytes acquired agglutinating properties (Fig. 5). This clearly demonstrates the outer position of the incorporated galactosyl residues.

This result is confirmed by the soybean agglutinin binding experiments. Fig. 6 shows that galactosylated lymphocytes exhibit a higher number of receptors for the lectin; however, the number of sites acquired by the cells is lower than the number of sites unmasked by sialidase treatment. This technique permits the estimation of the number of additional bound lectin molecules when lymphocytes are galactosylated. Calculations lead to an average value of 2×10^4 which makes it possible to assume a number of external galactosyl residues between 2 and 4×10^4 because soybean agglutinin possesses 2 saccharide binding sites per molecule. This result is in a good agreement with data obtained from the experiments dealing with radioactive precursors.

Conclusion

Taking into account the misleading effects of phagocytosis, UDP-Gal hydrolysis, galactose entry into the cells, our results clearly prove the existence, on the lymphocyte outer cell surface, of a galactosyltransferase whose active site can transfer galactose from UDP-Gal to exogenous acceptors or external membranous acceptors. Our conclusion may appear to conflict with recent results of Patt *et al.* [15] who did not detect ectogalactosyltransferase activity in mouse spleen lymphocytes. In fact, they use lymphocytes stimulated with concanavalin A where intracellular utilization of galactose is certainly higher than in resting cells and where ectogalactosyltransferase may have a lower level of activity as it has been recently described for ectosialyltransferase [19].

Experiments dealing with soybean agglutinin demonstrate that the galactosyl residues branched on the cell surface is external enough to behave as receptor for binding with a macromolecule. This result suggests that the transferase has to behave the same way when it binds the galactosyl residue. This supports the hypothesis which attributes a role to ectoglycosyltransferase in cellular or glycoprotein recognition and cell adhesion.

This research was supported in part by Grants from the C.N.R.S. (L.A. no. 217: *Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués* and *A.T.P. "Pharmacodynamie et Chimiothérapie"*, décision 5703) and by the *Commissariat à l'Energie Atomique*. We are very thankful to Dr N. Sharon for helpful discussions about studies with soybean agglutinin.

REFERENCES

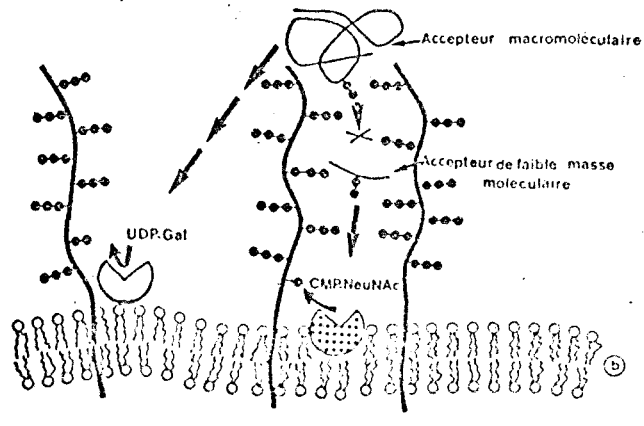
1. De Pierre, J. W. & Karnovsky, M. L. (1973) *J. Cell Biol. 56*, 275–303.
2. Bernacki, R. J. (1974) *J. Cell. Physiol. 83*, 457–466.
3. Roseman, S. (1970) *Chem. Phys. Lipids, 5*, 270–297.
4. Jamieson, G. A., Urban, C. L. & Barber, A. J. (1971) *Nat. New Biol. 234*, 5–7.
5. Roth, S., McGuire, E. J. & Roseman, S. (1971) *J. Cell Biol. 51*, 536–547.
6. McLean, R. J. & Bosmann, H. B. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 72*, 310–313.
7. Shur, B. D. & Roth, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta, 415*, 473–512.
8. Keenan, T. W. & Morré, D. J. (1975) *FEBS Lett. 55*, 8–43.
9. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) *FEBS Lett. 63*, 102–106.
10. Lamont, J. T., Perroto, J. L., Weiser, M. M. & Isselbacher, K. J. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 71*, 3726–3730.
11. Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H. & Sharon, N. (1972) *FEBS Lett. 24*, 193–196.
12. Lotan, R., Debray, H., Cacan, M., Cacan, R. & Sharon, N. (1975) *J. Biol. Chem. 250*, 1955–1957.
13. Deppert, W., Werchau, H. & Walter, G. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 71*, 3068–3072.
14. Bischoff, E., Tran-Thi, T. A. & Decker, K. F. A. (1975) *Eur. J. Biochem. 51*, 353–361.
15. Patt, L. M., Endres, R. O., Lucas, D. O. & Grimes, W. J. (1976) *J. Cell Biol. 68*, 799–802.
16. Hoyer, L. W. & Trabold, N. C. (1970) *J. Clin. Invest. 49*, 87–95.
17. Schnebli, H. P. & Dukor, P. (1972) *Eur. J. Immunol. 2*, 607–609.
18. Novogrodsky, A. & Katchalski, E. (1973) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 70*, 2515–2518.
19. Painter, R. G. & White, A. (1976) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 73*, 837–841.

A. Verbert, R. Cacan, and J. Montreuil, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Boîte postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

III - ETUDE DE L'ECTOSIALYLTRANSFERASE

A - ARTICLE III : Propriétés particulières de l'ectosialyltransférase envers les accepteurs exogènes

Tout comme dans le cas de l'ectogalactosyltransférase, la première partie de ce travail consistera à étudier l'activité ectoenzymatique en présence d'un accepteur exogène. Après avoir défini les paramètres cinétiques et l'effet de la concentration en cellules, nous avons montré l'existence d'une propriété particulière de l'ectosialyltransférase. En effet cet enzyme est actif sur les accepteurs exogènes de faible masse moléculaire mais inactif sur les accepteurs exogènes macromoléculaires. L'activité de cette ectosialyltransférase semble donc être restreinte à la sialylation des accepteurs membranaires puisque toute l'incorporation se situe à ce niveau. Cette propriété particulière plus récemment rapportée par BERNACKI et PORTER (410) montre que cet ectoenzyme profondément enfoncé dans la membrane serait efficace dans les processus de cis-glycosylation mais, contrairement à l'ectogalactosyltransférase, ne pourrait pas être impliqué dans les processus de trans-glycosylation. La figure 15 montre l'interprétation



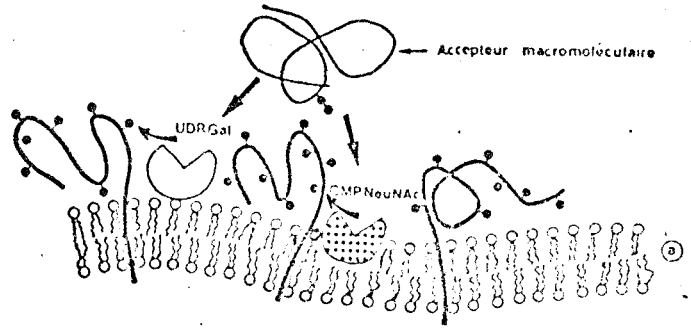


Figure 15 :

Interprétation de l'intégration de la galactosyl- et de la sialyltransférase a) au niveau des membranes intracellulaires
b) au niveau de la membrane plasmique
Dans tous les cas la glycosylation des accepteurs endogènes est possible, mais pour l'ectosialyltransférase la sialylation des accepteurs exogènes est limitée aux accepteurs de faible masse moléculaire.

galactosyltransférase sialyltransférase

que l'on peut donner du phénomène. Les enzymes des membranes intracellulaire et ceux des membranes plasmiques se distinguent à la fois par leur intégration dans la couche lipidique et leur microenvironnement. Dans le cas des membranes plasmiques, l'impossibilité de l'ectosialyltransférase à sialyler des macromolécules exogènes peut être le reflet de son profond enfouissement dans la couche lipidique et de l'accessibilité difficile de son site actif à cause de la présence des glycoprotéines membranaires. Par contre l'ectogalactosyltransférase peut profiter de sa position externe pour glycosyler les accepteurs macromoléculaires ou d'autres cellules. Au contraire, dans les cytomembranes, même si l'intégration des deux enzymes est la même, l'accessibilité de la sialyltransférase serait plus facile à cause du repliement des chaînes glycoprotéiques non complètement glycosylées. Comme la galactosyltransférase, la sialyltransférase peut alors glycosyler des macromolécules exogènes.

Ce type d'hypothèse a été également formulé pour expliquer l'agglutination de globules rouges avec des polymères de SBA employés à des concentrations telles que le monomère n'est pas actif. D'après N. SHARON (411) les sites de liaison de la lectine sont situés au niveau de la couche lipidique (glycanne des glycolipides) et la longueur d'une seule molécule de lectine ne permet pas la liaison avec une cellule adjacente alors que cette liaison est possible grâce à la longueur atteinte par le polymère.

Volume 74, number 2 FEBS LETTERS March 1977

PECULIAR BEHAVIOR OF ECTOSIALYLTRANSFERASE TOWARD EXOGENOUS ACCEPTORS

André VERBERT, René CACAN, Philippe DEBEIRE and Jean MONTREUIL
Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS No. 217, B.P. 36, 59650 Villeneuve D'Ascq, France

Received 22 December 1976

1. Introduction

The presence of sialic acid in the cell surface glycoconjugates has a crucial importance in a variety of biological cell properties. It has been involved in the electrokinetic potential of the cell [1] and in the permeability of the membrane [2]. More recently, it has been related to the social life of the cell: cell–cell recognition [3], contact inhibition [4] and crypticity of immunogenic loci [5]. Moreover, changes in membrane-bound sialic acid have been reported to occur upon oncogenic transformation [6]. Furthermore, the sialic acid level at the cell surface seems to be correlated to the life-time of the cell [7] and to regulate the activity of some ecto-enzymes [8].

These facts raise the question as to how the surface sialic acid level is maintained or modulated: does it need an intracellular biosynthesis of the complete glycoconjugates and their further integration in the membrane or may it be due to the activity of an ectosialyltransferase as a repair phenomenon? In fact, ectosialyltransferase activity has been widely reported [9–12] and ultrastructural evidence has been obtained [13]. In this paper, we demonstrate that rat spleen lymphocyte possesses an ectosialyltransferase which is able to transfer *N*-acetylneuraminic acid to its own membrane but is not able to transfer it to a macromolecular exogenous acceptor. However, when the size of the same exogenous acceptor is reduced by proteolytic cleavage, it can reach the active site of the ecto-enzyme and is efficiently glycosylated.

2. Materials and methods

2.1. *Preparation of cells, crude homogenate and microsomal fractions*

Spleen lymphocytes were prepared from three month old Sprague-Dawley rats as previously described [14]. Lymphocyte suspension was homogenized in a Potter-Elvejhem apparatus (3 × 10 strokes at 1250 rev./min). The homogenate was centrifuged at 15 000 × *g* for 20 min and the resulting supernatant was used for preparation of microsomal fractions by centrifugation (150 000 × *g* for 90 min). The acceptor capacity of the various asialoglycoproteins was also tested with rat liver microsomal fractions prepared according to the same procedure.

2.2. *Preparation of macromolecular acceptors*

Orosomucoid (α_1-acid glycoprotein) was isolated from pooled human serum by the procedure of Schmid et al. [15]. Glycophorin was extracted from ORh^+ human erythrocyte ghosts as described by Marchesi and Andrews [16]. Orosomucoid and glycophorin were desialylated by mild hydrolysis (0.01 N H_2SO_4, 100°C, 30 min). Effective desialylation was checked by gas–liquid chromatography analysis. Coupling of acceptors to Sepharose 4 B beads was achieved as previously described [14].

2.3. *Preparation of micromolecular acceptor*

Asialoglycophorin was subjected to extensive pronase (Calbiochem) digestion (1 mg for 50 mg of

asialoglycoprotein, during 72 h at 37°C). A low molecular weight glycopeptide has been purified by chromatography on Biogel P-6 column [17]. Its molecular weight has been estimated to around 1500 according to its distribution coefficient, its carbohydrate molar composition is Gal*NA*c : Gal (1 : 1) as determined by gas–liquid chromatography.

2.4. *Sialyltransferase assays*

The incubation mixture contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM $MnCl_2$ and 0.2 μCi/ml of [^{14}C]NANA–CMP (Amersham, spec. act. 214 mCi/mM). Standard assays (100 μl) contained 2×10^7 cells and 1 mg of acceptors. Incubation was achieved at 30°C, under a constant slow rotation, for 1 h.

2.5. *Separation of cell from acceptors and determination of radioactivity*

Macromolecular or Sepharose-bound acceptors were separated from cells as described previously [14]. When micromolecular acceptor was used, the supernatant after the cell sedimentation was spotted on Whatman 3 paper and submitted to chromatography in the following solvent: ethyl acetate/pyridine/glacial acetic acid/water (5 : 5 : 1 : 3). The acceptor-bound radioactive sialic acid remained near the origin free of precursor ([^{14}C]NANA–CMP) and of degradation products ([^{14}C]NANA) which had migrated. The radioactivity of the material was determined by counting in scintillation liquid.

3. Results and discussion

3.1. *Kinetic studies of ectosialyltransferase activity with macromolecular acceptors*

As we previously demonstrated, the use of an insolubilized acceptor is a good approach to detect ectogalactosyltransferase on intact lymphocytes [14], we devised the same experiments for ectosialyltransferase. Incubation of lymphocytes with asialo-orosomucoid coupled beads and [^{14}C]NANA–CMP reveals that incorporation of radioactivity is restricted to the cells. The non-incorporation on an insolubilized acceptor could be due to an alteration of acceptor sites by the chemical treatment for coupling. In fact, fig.1a shows a kinetic study using soluble asialo-

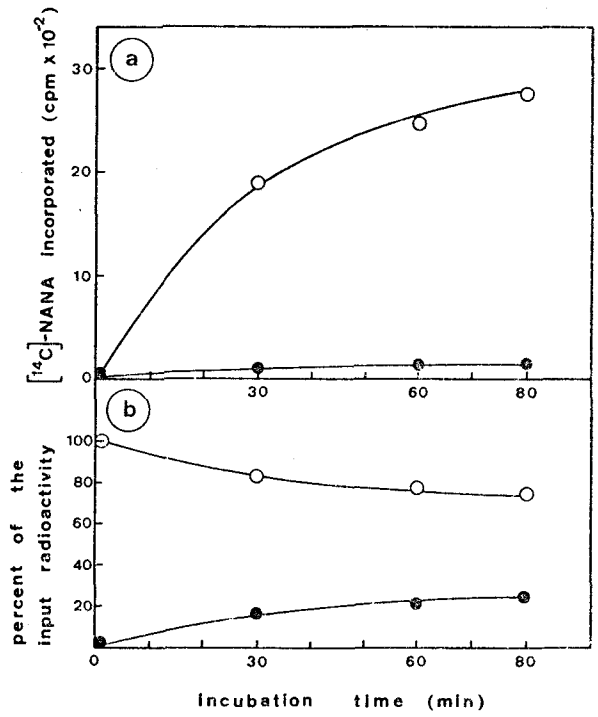


Fig.1.(a) Kinetic study of the incorporation of radioactive sialic acid on lymphocytes (○——○) and on soluble asialo-orosomucoid (●——●). (b) Kinetic study of the NANA–CMP integrity (○——○) and free NANA appearance (●——●).

orosomucoid. Again, no significant radioactivity is bound to the acceptor compared to the radioactivity recovered with the cells. This fact has been noticed by Patt and Grimes with fibroblasts [18]. As described for rat liver plasma membrane [19], whole lymphocyte exhibits a NANA–CMP hydrolase activity, which contributes to the formation of free sialic acid in the medium (fig.1b). As sialic acid may enter the cell [20] we checked that a 1000-fold excess of unlabelled sialic acid does not reduce significantly (less than 10%) the radioactivity of the cells. This indicates that entry of [^{14}C]NANA cannot explain the labelling of the cells.

3.2. *Influence of the cell concentration*

As the standard assay contained 2×10^8 cells/ml it was worth examining if higher concentration of cells, i.e., of enzyme, could lead to a sialylation at a higher level of the exogenous acceptor. Figure 2 reveals that,

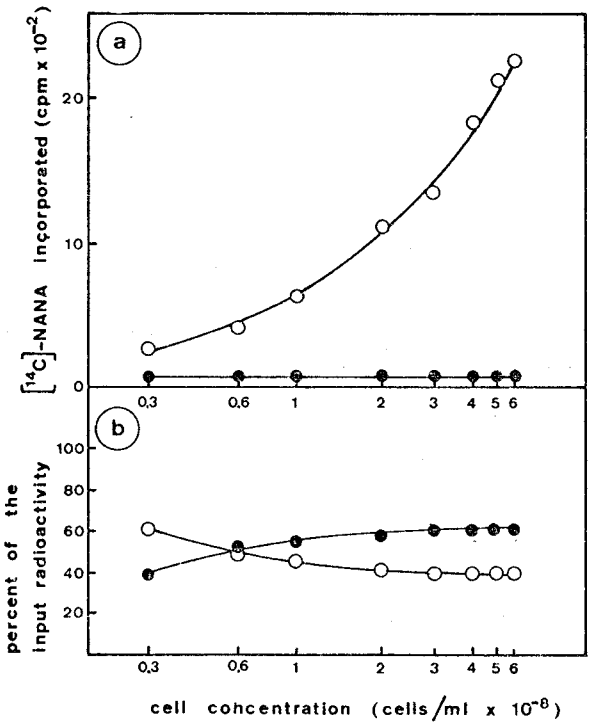


Fig.2.(a) Effect of cell concentration on the incorporation of radioactive sialic acid on the cells (○——○) and on soluble asialo-orosomucoid (●——●). (b) Effect of cell concentration on NANA–CMP integrity (○——○) and free NANA appearance (●——●). Logarithmic scale is used to represent the cell concentration.

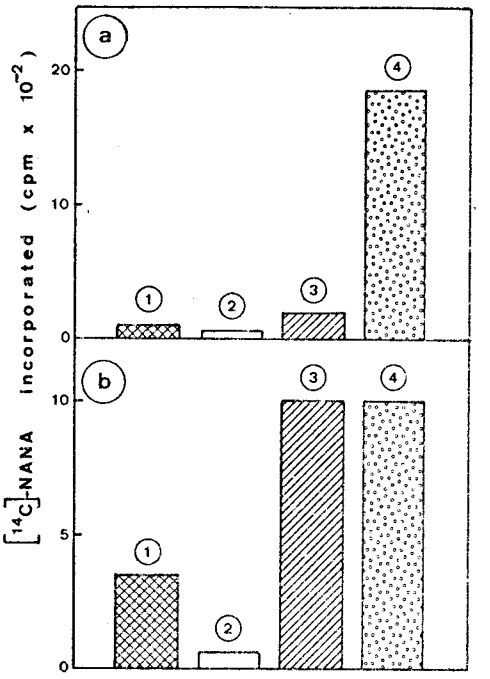


Fig.3. Relative incorporation of various macromolecular and micromolecular acceptors with (a) whole cells and (b) microsomal fraction. The various acceptors are as follows: (1) asialo-orosomucoid, (2) ovomucoid, (3) asialoglycophorin, (4) glycopeptidic acceptor. Acceptors have been used at a final concentration of 10 mg/ml except for the micromolecular (glycopeptidic) acceptor for which the dilution (8 mg/ml) has been done to obtain the 1 : 1 ratio of incorporation as compared to asialoglycophorin when assayed with microsomal fraction.

at any concentration, the cells are not able to catalyze the transfer on a macromolecular acceptor although a cell concentration-dependency is noted for the cell surface sialylation. In addition this shows that, if significant, [^{14}C]NANA incorporation on the exogenous acceptor does not behave as the endogenous membrane acceptors.

3.3. *Comparison between sialylation of macro- and micromolecular acceptors*

Non-incorporation of sialyl residues on asialo-orosomucoid could be due to the inability of this acceptor to form the enzyme–substrate complex with the lymphocyte ectosialyltransferase. To test this possibility we used two other acceptors:

(i) Native ovomucoid which is a poor sialyl acceptor (one terminal galactosyl residue per glycan moiety [21]) but which has been a suitable acceptor in the lymphocyte system [14].

(ii) Asialoglycophorin whose very good acceptor capacity is due to its high content of sialyl residues in the native form, moreover is a membrane glycoprotein.

As asialo-orosomucoid, these two asialoglycoproteins cannot be significantly sialylated by intact lymphocytes (fig.3a) however, they appeared as good acceptors of sialyl residues when assayed with microsomal sialyltransferase (fig.3b).

Thus it raises the question as to whether this peculiar property may be related to the fact that a macromolecular exogenous acceptor cannot reach the active site of the ecto-enzyme. To answer this question, ectosialyltransferase has been tested with a small

glycopeptide obtained after extensive pronase digestion of the asialoglycophorin. Figure 3a shows that this micromolecular acceptor may be highly sialylated by the ectosialyltransferase if compared to the sialylation of the originating macromolecule. When the acceptor capacity is equal for macromolecular and micromolecular acceptor in a microsomal system, the sialylation of the macromolecular acceptor decreases in a large extent (more than 5-times) with intact cell system (95% viability).

3.4. *Additional proof of this peculiar ectosialyltransferase activity*

The peculiar properties of the enzymic activity detected with whole cells favored the existence of an ectosialyltransferase. However, on the one hand, phagocytosis of acceptors and further intracellular glycosylation may not be excluded. On the other hand, whole cell preparations contain from 1–10% broken cells which could be responsible for the detected sialyltransferase activity. To demonstrate clearly the involvement of an ecto-enzyme we devised the experiments recommended by Lennarz [22]. Figure 4 shows that as the proportion of broken cells is increased, incorporation of sialyl residues on asialo-orosomucoid and micromolecular acceptor

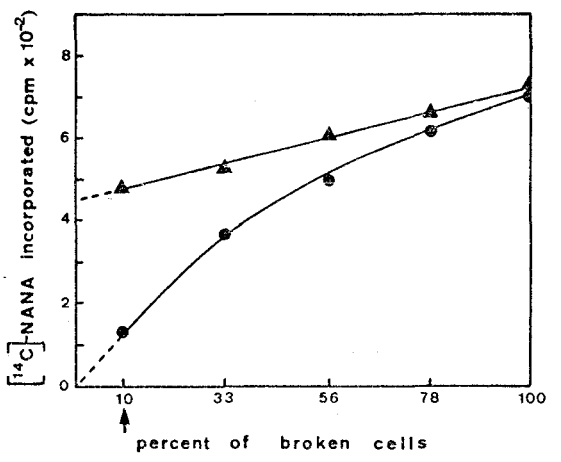


Fig.4. Sialic acid incorporation as a function of the percentage of broken cells present in an incubation, on the soluble asialo-orosomucoid (●——●) and on the glycopeptidic micromolecular acceptor (▲——▲). Mixture of known proportion of intact and broken cells were added to the incubation medium. In this experiment 90% of the stock suspension of cells excluded Trypan Blue (arrow).

increases. More important is the fact that extrapolation to 100% intact cells indicates significant incorporation on the micromolecular acceptor but no incorporation on the macromolecular acceptor. Thus, the intracellular enzyme may be monitored by the sialylation of asialo-orosomucoid and the low level of [^{14}C] NANA transfer on macromolecular acceptors, observed with whole cell incubations, is due to the low proportion of broken cells. Macromolecular acceptor sialylation inability appears to be a peculiar property of the lymphocyte ectosialyltransferase.

4. Conclusion

Demonstration ectoglycosyltransferase occurrence requires three main criteria [23]:

(i) No entry of free carbohydrate into the cell if precursor hydrolysis occurs

(ii) No release or secretion of intracellular enzymes,

(iii) No phagocytosis of acceptors.

Cell-labeling obtained with [^{14}C]NANA–CMP in the presence of excess unlabelled NANA allows us to exclude the first cause of error. Secondly, as transfer on macromolecular acceptor is not observed with intact cells it is rather difficult to consider that phagocytosis and further release of the sialylated product may occur. Finally, experiments with increasing proportion of broken cells allow us to determine that the depicted transferase activity is really due to an ectosialyltransferase. This peculiar property of the ecto-enzyme to transfer sialic acid on micromolecular acceptor or on the nearby membranous acceptors, strongly suggests that it is a rather buried 'intrinsic' membrane enzyme. This enzyme would be more concerned with the sialylation of surrounding membranous acceptors in a '*cis*-glycosylation' process. This role in repairing the cell surface glycoconjugates is in a good accordance with observations of Harms and Reutter [24] showing that membrane sialic acid has a higher turnover rate than the membrane proteins. This sialic acid renewal appears to be crucial for many biological properties of the cell.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the CNRS (L.A. No 217: Biologie Physico-Chimique et

Moléculaire des Glucides Libres et Conjugués and ATP du CNRS 'Pharmacodynamie et Chimiothérapie') and by the Commissariat à l'Energie Atomique. We are very thankful to Dr Fournet (Université des Sciences et Techniques de Lille I) for his gift of orosomucoid and for the gas–liquid chromatography analysis.

References

[1] Forrester, J. A., Ambrose, E. J. and Stoker, M. G. P. (1964) Nature 201, 945–946.
[2] Glick, J. L. and Githens, S. (1965) Nature 208, 88.
[3] Kemp, R. B. (1971) Folia Histochem. Cytochem. 9, 25–30.
[4] Burger, M. M. (1970) Nature 227, 170–171.
[5] Currie, G. A. and Bagshawe, K. D. (1969) Br. J. Cancer. 23, 141–149.
[6] Van Beek, W. P., Smets, L. A. and Emmelot, P. (1973) Cancer Res. 33, 2913–2922.
[7] Jancik, J. and Schauer, R. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 395–400.
[8] Stefanovic V., Mandel, P. and Rosenberg, A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 493–497.
[9] Grimes, W. J. (1973) Biochemistry 12, 990–996.
[10] Datta, P. (1974) Biochemistry 13, 3987–3991.
[11] Painter, R. G. and White, A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 837–841.
[12] Shur, B. D. and Roth, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 473–512.
[13] Porter, C. W. and Bernacki, R. J. (1975) Nature 256, 648–650.
[14] Cacan, R., Verbert, A. and Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102–106.
[15] Schmid, K., MacNair, M. B. and Burgi, A. F. (1958) J. Biol. Chem. 230, 853–864.
[16] Marchesi, V. T. and Andrews, E. P. (1971) Science. 174, 1247–1248.
[17] Debeire, P., Cacan, R., Fournet, B. and Montreuil. J. (1977) (manuscript in preparation).
[18] Patt, L. M. and Grimes, W. J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4157–4166.
[19] Kean, E. L. and Bighouse, K. J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7813–7823.
[20] Hirschberg, C. B., Goodman, S. R. and Green, C. (1976) Biochemistry 15, 3591–3599.
[21] Bayard, B. and Montreuil, J. (1974) Actes Colloq. Int. No 221 CNRS, Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq 1973, CNRS, Paris 1, 209–218.
[22] Struck, D. K. and Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2511–2519.
[23] Keenan, T. W. and Morré, D. J. (1975) FEBS Lett. 55, 8–13.
[24] Harms, E. and Reutter, W. (1974) Cancer Res. 34, 3165–3172.

B - ARTICLE IV : Mise en évidence d'un inhibiteur intracellulaire de l'ectosialyltransférase du lymphocyte

Nous avons vu (article III) que la radioactivité incorporée sur les cellules lors de l'incubation avec du CMP-[^{14}C] -NeuNAc n'est pas due à l'entrée de sucre libre. Pour pouvoir conclure à la présence d'une activité ectosialyltransférasique c'est-à-dire à la présence de l'enzyme et des accepteurs endogènes, il faut éliminer l'objection des cellules cassées : la radioactivité liée aux cellules est-elle due à la présence d'un faible pourcentage de cellules cassées dans la suspension cellulaire? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un artifice méthodologique préconisé par STRUCK et LENNARZ (412) qui consiste à déterminer l'incorporation d'une suspension de cellules (dont le pourcentage de cellules cassées est mesuré par la méthode du Bleu Trypan par exemple) et de mélanges contenant des proportions connues de cellules entières et de cellules cassée (le point 100 % de cellules cassées étant un homogénat réalisé avec la même concentration en cellules que la suspension utilisée au départ. Une extrapolation à 0 % de cellules cassées donne la valeur de l'activité ectoenzymatique (voir figure 16).

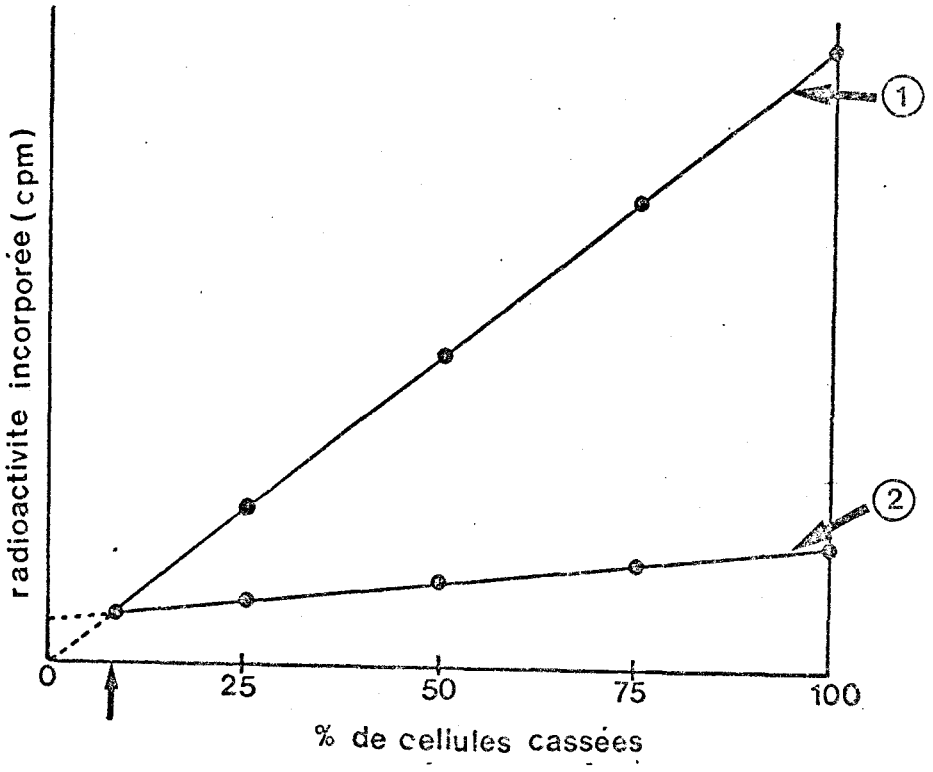


Figure 16 :

Schéma illustrant l'extrapolation de STRUCK et LENNARZ (413) qui consiste à mesurer la radioactivité incorporée par une suspension stock de cellules (flèche) dont le pourcentage de cellules cassées est connu, et de mélanges contenant des proportions connues de cellules entières et de cellules cassées. L'extrapolation à 0 % de cellules cassées permet de conclure à l'absence (courbe 1) ou à la présence (courbe 2) d'ectoenzymes.

Après avoir vérifié la validité de cette méthodologie sur la galactosyltransférase pour laquelle l'extrapolation à 0 % de cellules cassées donne une valeur significative pour l'activité ectogalactosyltransférasique, la technique a été appliquée à la détermination de l'activité ectosialyltransférasique.Dans ce cas nous avons été surpris de constater que l'extrapolation à 0 % de cellules cassées donne une activité sialyltransférasique plus élevée que celle de l'homogénat. De telles observations avaient été faites par PATT et GRIMES avec des cellules SVT_2 (414) et plus récemment par CERVEN (415) mais ces auteurs n'ont trouvé aucune explication au phénomène.

L'article IV décrit la mise en évidence d'un inhibiteur cytosoluble et thermolabile de l'activité ectosialyltransférasique. La libération de cet inhibiteur lors de l'homogénéisation des lymphocytes, conduit à une baisse de l'activité sialyltransférasique.

Volume 81, number 1 FEBS LETTERS September 1977

OCCURRENCE OF AN INTRACELLULAR INHIBITOR OF ECTOSIALYLTRANSFERASE IN LYMPHOCYTES

René CACAN, André VERBERT, Bernard HOFLACK and Jean MONTREUIL
Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS No. 217, BP 36, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Received 27 June 1977

1. Introduction

One of the final steps in sialoglycoconjugate biosynthesis involves the transfer of sialic acid to glycan moieties by means of sialyltransferases. It has been demonstrated that the presence of sialic acid at the non-reducing end of glycoconjugates has a biological significance either at a molecular level or at a cellular level: sialyl residues appear to be signal for the life time of serum glycoproteins [1] or cells [2,3] and have related to cellular adhesion [4] and crypticity of immunogenic loci [5].

As far as the biogenesis of the membrane is concerned, the question is to know whether the stepwise biosynthesis of glycans follows the pathway of the membrane flow. If such is the case, the final sialylation could occur at the cell surface, thus involving an ectosialyltransferase whose activity has been widely reported [6–9]. In this work we demonstrate the presence of an intracellular inhibitor of the lymphocyte ectosialyltransferase. This finding leads to the hypothesis that sialyltransferases might be 'shut off' inside the cell and would become active, as an ectoenzyme, when it reaches the outer cell surface where the inhibitor is no more present.

2. Materials and methods

2.1. *Preparation of cells, crude homogenate and postmicrosomal supernatant*

Spleen lymphocytes were prepared from two month old Sprague-Dawley rats as previously described [10]. Lymphocyte suspension (5.10^8 cells/ml) was homogenized in a cooled Potter-Elvejhem apparatus (3 × 10 strokes at 1250 rev/min). The homogenate (also called broken cells) was centrifuged at 150 000 × *g* for 1 h. The resulting supernatant was used as source of inhibitor.

2.2. *Preparation of acceptors*

Orosomucoid (α_1-acid glycoprotein) was isolated from pooled human serum by the procedure of Schmid et al. [11] and further desialylated by mild hydrolysis (0.01 N H_2SO_4, 100°C, 30 min). Effective desialylation was checked by gasliquid chromatography analysis.

Ovomucoid was prepared as previously described [10].

2.3. *Glycosyltransferase assays*

For the sialyltransferase assays the incubation mixture contains 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM $MnCl_2$ and 0.2 μCi/ml of [^{14}C]NANA–CMP (Amersham, specific activity 214 mCi/mM, i.e., an average value of 400 cpm/pM). Standard assays (100 μl) contained 2.10^7 cells and 1 mg acceptor. Incubation was achieved at 30°C, under a slow rotation, during 1 h.

The galactosyltransferase assays were performed as previously described [12].

2.4. *Determination of radioactivity of cells and acceptors*

Radioactivity incorporated on the acceptor was measured by difference between two assays, one without exogenous acceptor.

Recovery of acid-precipitable materials, analysis of

precursor degradation and counting were achieved as previously described [10].

3. Results and discussion

3.1. *Galactosyl and sialyltransferase activities as a function of the percentage of broken cells*

Assignment of sialyl- or galactosyltransferase activity to ecto-enzymes by using whole cells incubations may be faulty by the presence of a certain percentage of broken cells. To determine whether the measured activities are due to broken cells, mixtures containing definite propertions of intact and broken cells were incubated with either [^{14}C]Gal–UDP or [^{14}C]NANA–CMP as recommended by Struck and Lennarz [13]. Figure 1a shows that, in the case of galactosyltransferase, extrapolation to zero percent of broken cells leads to a lower but significant incorporation in both endogenous and exogenous (ovomucoid) acceptors. This result is in total agreement with the ectogalactosyltransferase activity we previously depicted on lymphocyte cell surface [10]. Furthermore, as expected, an increasing incorporation is observed with an increasing release of intracellular enzymes. In the case of the sialyltransferase (fig.1B), although an increasing amount of intracellular enzyme is liberated by breakage of the cells as revealed by the sialylation of the asialo-orosomucoid [9], surprisingly, the radioactivity bound to endogenous acceptors decreases while the proportions of broken cells increases.

On one hand the latter phenomenon could be accounted for by an increasing degradation of the precursor by the homogenate. In fact, analysis of the precursor integrity after incubation reveals that NANA–CMP degradation is not meaningfully different between whole cells and broken cells (from 30% to 10% of the input NANA–CMP hydrolysed into free NANA). The availability of NANA–CMP is monitored otherwise by the sialylation of the exogenous acceptor. On the other hand, entry of this newly formed radioactive free NANA into cells [14] could be responsible for the higher labelling of whole cells if compared with broken cells. In fact, a 1000-fold excess of unlabelled sialic acid does not reduce the phenomenon.

Consequently, the reduced incorporation of sialyl residues by broken cells does not reflect an artefactual event but has to be correlated with either an inhibited transfer reaction or a post reactional removal of sialyl residues such as the action of a neuraminidase [15].

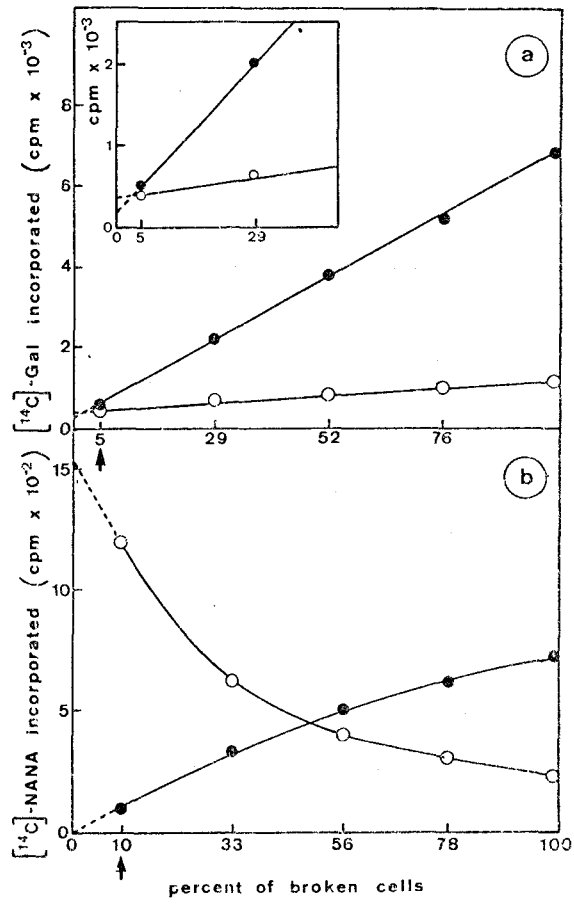


Fig.1. (a) Galactose incorporation as a function of the percentage of broken cells present in an incubation, on the endogenous acceptors (○——○) and on ovomucoid (●——●). (b) Sialic acid incorporation as a function of the percentage of broken cells present in an incubation, on the endogenous acceptors (○——○) and on asialoorosomucoid (●——●). Arrows indicate the percent of broken cells in the stock suspension as judged by trypan blue exclusion test.

3.2. *Presence of the ectosialyltransferase inhibitor in the postmicrosomal supernatant*

When increasing amounts of post microsomal supernatant are incubated with whole cells in standard ectosialyltransferase assays, the number of radio-

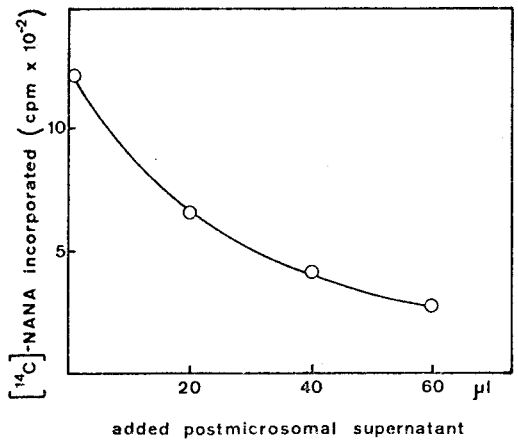


Fig.2. Effect of postmicrosomal supernatant on ectosialyltransferase activity. Increasing amounts of supernatant are added to equal amounts of whole lymphocytes in a standard incubation mixture.

active sialyl residues bound to the cells is decreasing as shown in fig.2. Thus, the effect previously observed with broken cells may be reproduced by using only post microsomal supernatant. This indicates that the effector is present in a subcellular fraction which otherwise does not exhibit any sialyltransferase activity. It was then possible to test whether this effector was an inhibitor or a post reactional destroying factor.

Table 1 shows that the post microsomal supernatant is not able to cleave off the newly bound sialyl residues in a post reactional process (table 1b) but its action is recovered only when it is added during the incubation (table 1a). This fact proves the presence of an inhibitor of the ectosialyltransferase in the post microsomal supernatant. In addition, this inhibitor is a thermolabile factor, which suggests its macromolecular nature.

3.3. *Additional proofs for an intracellular inhibitor of ectosialyltransferase*

If we assume that ectosialyltransferase is active only at the outer cell surface, where no inhibitor occurs, this activity measured in whole cell incubations must be strictly proportional to the number of enzyme, i.e., of cells, leading to a constant specific activity.

On the contrary, in assays with increasing concentration of broken cells where concommitant inhibitor

Table 1

Assay	Radioactivity bound to cells (cpm)
(a) Standard assay	
Complete	1108
Complete plus 50 µl postmicrosomal supernatant	591
Complete plus heat-treated[a] postmicrosomal supernatant	1048
(b) Standard assay[b]	
Complete	1062
Complete plus 1 h postincubation with cacodylate buffer, 30°C	986
Complete plus 1 h postincubation with 50 µl postmicrosomal supernatant, 30°C	993

[a] Heat-treatment has been achieved by maintaining the supernatant at 100°C for 3 min

[b] In this set of experiments the cells were sialylated in standard assays and then the precursor was washed off by low-speed centrifugation before either acid-precipitation or postincubation

concentration increases, the specific activity should fall down. This fact is clearly illustrated by fig.3 for which sialyltransferase specific activity is plotted versus whole cell and broken cell concentrations.

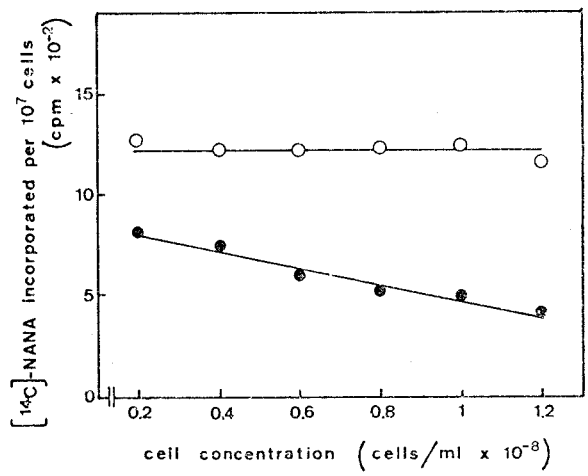


Fig.3. Variations of sialyltransferase specific activity when assays are performed with increasing concentration of whole cells (○——○) and with increasing concentration of broken cells (●——●). The measured activities concerned the transfer of sialyl residues on endogenous acceptors.

4. Conclusion

The starting point of this work has been the observation that the sialyltransferase activity is higher in whole cell incubations than in homogenates. A similar datum has been obtained by Patt and Grimes with SV T2 cells [16]. We demonstrate that this phenomenon is not an artifactual event but is due to release of an intracellular sialyltransferase inhibitor by breakage of the cells.

On one hand, we reported previously [9] that the ectosialyltransferase is ascribed to the sialylation of endogenous membrane acceptors and cannot sialylate macromolecular exogenous acceptors. On the other hand, we demonstrate in this paper that an intracellular inhibitor affects the sialylation of the endogenous acceptors without meaningfully inhibiting the sialylation of exogenous acceptor. These two facts strongly suggest that this inhibitor is specific to ectosialyltransferase.

The finding of such an inhibitor allows us to propose that the final sialylation of the surrounding membrane glycoconjugates could occur only when the ectosialyltransferase reaches the outer cell surface at the end of the membrane flow process.

Acknowledgments

We are very thankful to Professor Paul Mandel for his helpful suggestions and discussions. The research was supported by grants from the CNRS (LA No. 217: Biologie Physico-Chimique et Moléculaire des Glucides Libres et Conjugués and ATP Pharmacodynamie et Chimiothérapie) and by the Commissariat à l'Energie Atomique. Bernard Hoflack received a fellowship from the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

References

[1] Ashwell, G. and Morell, A. G. (1974) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 41, 99–128.
[2] Jancik, J. and Schauer, R. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 395–400.
[3] Woodruff, J. J. and Gessner, B. M. (1969) J. Exp. Med. 129, 551–561.
[4] Deman, J. J., Brugnell, E. A. and Marcel, M. M. (1974) J. Cell Biol. 60, 641–652.
[5] Currie, G. A. and Bagshawe, K. D. (1969) Brit. J. Cancer. 23, 141–149.
[6] Grimes, W. J. (1973) Biochemistry 12, 990–996.
[7] Shur, B. D. and Roth, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 473–512.
[8] Porter, C. W. and Bernacki, R. J. (1975) Nature 256, 648–650.
[9] Verbert, A., Cacan, R., Debeire, Ph. and Montreuil, J. (1977) FEBS Lett. 74, 234–238.
[10] Cacan, R., Verbert, A. and Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102–106.
[11] Schmid, K., Mac Nair, M. B. and Burgi, A. F. (1958) J. Biol. Chem. 230, 853–864.
[12] Verbert, A., Cacan, R. and Montreuil, J. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 49–53.
[13] Struck, D. K. and Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2511–2519.
[14] Hischberg, C. B., Goodman, S. R. and Green, C. (1976) Biochemistry 15, 3591–3599.
[15] Carubelli, R. and Yeh, A. K. (1974) Behring Inst. Mitt. 55, 88–90.
[16] Patt, L. M. and Grimes, W. J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4157–4165.

C - ARTICLE V : Détection de l'activité ectosialyltransférasique en utilisant des cellules entières : correction de l'erreur due à la libération de CMPNeuNAc intracellulaire

Après la mise en évidence d'un inhibiteur de l'activité ectosialyltransférasique (article IV) nous nous sommes attachés à purifier et à caractériser la molécule responsable de cet effet. Après homogénéisation des lymphocytes le surnageant 150 000 g est purifié par gel – filtration, et les fractions contenant l'inhibiteur sont analysées par chromatographie sur papier et électrophorèse.

Après purification, quelques propriétés de l'inhibiteur ont été étudiées et comparées à celle du CMP-NeuNAc. Cette étude peut être résumée comme suit :

1 : le CMP-[^{14}C]-NeuNAc se comporte sur colonne comme l'inhibiteur (élution au Vo + Vi) ;

2 : il est entièrement dégradé en NeuNAc libre après chauffage à 100° C pendant 3 min. ;

3 : il est insensible comme l'inhibiteur à la papaïne et à la pronase ;

4 : son comportement chromatographique et électrophorétique est identique à celui de l'inhibiteur ;

5 : la preuve de l'identité de l'inhibiteur a été apportée par sa sensibilité à la CMP-Neu NAc hydrolase purifiée du sérum de Rat qui nous a été généreusement donnée par Stéphane BOUQUELET que nous remercions vivement.

Ainsi la baisse d'incorporation observée après incubation de cellules cassées avec du CMP-[^{14}C]NeuNAc par rapport à l'incorporation de cellules entières est due à la libération de CMP-NeuNAc intracellulaire conduisant à une baisse de l'activité spécifique du précurseur. La courbe d'inhibition est en fait une courbe de dilution isotopique.

Cette étude sur l'ectosialyltransférase nous a permis de déceler une cause d'erreur non encore suspectée dans la détection des activités ectoglycosyltransférasiques : la libération de précurseur intracellulaire par les cellules cassées. Celle-ci est particulièrement importante : elle remet en question le dosage des activités glycosyltransférasiques mené sur des cellules entières ou des homogénats et par conséquent elle jette un doute sur les travaux qui consistent en la comparaison d'activités ectoglycosyltransférasiques (entre cellules et homogénat par exemple ou lors de l

transformation cellulaire, ou encore au cours du cycle cellulaire). En effet l'incorporation obtenue dans les conditions classiques dépend de la quantité de cellules cassées qui se trouve dans le milieu d'incubation, une faible variation de cette valeur provoque des variations importantes dans l'activité mesurée.

Pour tenir compte de cette nouvelle cause d'erreur, nous avons mis au point une nouvelle méthode de détection des activités ectoglycosyltransférasiques. Elle consiste dans un premier temps à mesurer l'accroissement d'activité glycosyltransférasique apporté par des cellules entières, lorsque celle-ci est mesurée en présence de quantité quasi-constante d'homogénat, c'est-à-dire à même dilution isotopique du précurseur. Dans un second temps, elle permet de déterminer si cet accroissement d'activité apporté par les cellules entières n'est dû qu'à la présence d'ectoaccepteurs ou si elle résulte de l'activité d'ectoenzymes.

Cette méthode est la seule qui permet de tenir compte de la libération à la fois de précurseur intracellulaire et de l'activité enzymatique par les cellules cassées. L'application de cette technique nous a permis de confirmer la présence d'une ectosialyltransférase et d'accepteurs d'acide N-acétylneuraminique sur la membrane lymphocytaire.

Biochim. Biophys. Acta (sous presse)

DETECTION OF ECTOSIALYLTRANSFERASE ACTIVITY USING WHOLE CELLS : CORRECTION OF MISLEADING RESULTS DUE TO THE RELEASE OF INTRACELLULAR CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID.

Bernard HOFLACK, René CACAN, Jean MONTREUIL and André VERBERT *

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217
Université des Sciences et Techniques de Lille I, B.P. 36,
59650 - VILLENEUVE D'ASCQ, France.

*To whom all correspondence should be sent

SUMMARY

Assignment of sialyltransferase activity to ecto-enzyme by using whole cell incubations may be faulty due to the presence of a certain percentage of broken cells. To determine whether the measured activities are due to broken cells, mixtures containing definite proportions of intact and broken cells were incubated with exogenous CMP-N-acetyl{^{14}C} Neuraminic acid (CMP-{^{14}C}NeuNAc), extrapolation to zero percent of broken cells gives the ectosialyltransferase activity. Surprisingly, we observed that the resulting incorporation onto endogenous acceptors is higher for whole cells than for homogenate. This inhibitory effect due to broken cells is recovered with a heat-labile, cytosoluble, low molecular weight compound. This compound has been purified, characterised as CMP-NeuNAc by its behavior in various chromatographic and electrophoretic systems and its susceptibility to CMP-NeuNAc hydrolase. This endogenous CMP-NeuNAc leads to an isotopic dilution of the exogenous labelled CMP-NeuNAc and explains the apparent lowest activity observed for homogenate by various authors. As this isotopic dilution varies with the proportion of broken cells, the radioactivity bound to endogenous acceptors cannot be related to a known number of sialyl residues transferred, calling into question the validity of plotting the amount of incorporated {^{14}C}NeuNAc versus various percentages of broken cells that we previously described. Taking this fact into account, a new approach has been developed to detect ectoglycosyltransferaseswhen using whole cells. This method allowed us to prove that rat spleen lymphocytes possess ectosialyltransferases whose activity toward exogenous acceptors is restricted to low molecular weight compounds and whose endogenous activity strictly concerns the plasma membrane.

INTRODUCTION :

Ectoglycosyltransferases are defined as membrane-bound enzymes whose active sites are accessible from the outside of the cell {1}. During the past few years, ultrastructural {2} and biochemical evidence {3-7} for ectosialyltransferase activity has accumulated for review see {8, 9}. In most experiments the biochemical proofs for the surface localisation of such ectoenzymes are obtained by incubating whole cells with labelled nucleotide-sugar, assuming that the resulting incorporation into acid precipitable acceptor molecules is due to ectoglycosyltransferase activity. As pointed out by Keenan and Morré {10} this methodology is not without faults and in previous studies {11, 12} we developed procedures to avoid the main causes of errors. Particularly, attention has been focused on determining whether or not the detected sialyltransferase activity is due to the small percentage of broken cells in the assay. For this, we used the method recommended by Struck and Lennarz {13} : sialyltransferase activity of mixtures containing definite proportions of intact and broken cells are measured and extrapolation to zero percent broken cells gives the measurement of the ectoenzyme activity alone. In our hands, using lymphocytes, we were surprised to observe that the radioactivity bound to endogenous acceptors decreases while the proportion of broken cells increases. Further investigations {12} lead us to postulate the presence of a heat-labile, cytosoluble inhibitor of ectosialyltransferase activity.

In this paper, we demonstrate that the inhibitory effect is due to the release of intracellular CMP-N-Acetylneuraminic acid (CMP-NeuNAc) by broken cells leading to a decrease of the transferred radioactive sialyl residues caused by isotopic dilution of the labelled precursor. This result brings the experimental procedure proposed by Struck and Lennarz {13} into question again : the radioactivity bound to endogenous acceptors does not reflect the real amount of incorporated NeuNAc residues and consequently extrapolation to 100 percent intact cells is no longer valid. Thus we developed an original procedure to detect ectosialyltransferase activity at the outer surface of cells taking into account the fact that both intracellular sialyltransferases and endogenous CMP-NeuNAc may be introduced by the small percentage of broken cells in the assay. Using this methodology, we confirm the presence of sialyltransferase at the outer surface of lymphocytes which is able to transfer sialyl residues to its own membranes and to low molecular weight exogenous acceptors, but is not able to transfer them to high molecular weight exogenous acceptors.

EXPERIMENTAL

Materials. All reagents were of analytical grade. CMP-{^{14}C}NeuNAc was purchased from Radiochemical Centre Amersham, England (specific activity 214 mCi/mM i.e. an average value of 400 cpm/pM). Fetuin was purchased from Sigma Chemical Co., St Louis (U.S.A.) and used as acceptor after desialylation by mild acid hydrolysis (0.01 N H_2SO_4, 100°C,

30 min). Effective desialylation was checked by gas-liquid chromatography analysis. Lactose (Sigma Chemical Co) was used as low molecular weight acceptor. Pronase (4 U/mg) and insolubilized papain (E.C. 3.4.22.2, 80 U/g carrier-fixed enzyme) was obtained from Sigma Chemical Co, St Louis, U.S.A. and from Boehringer GmbH, Mannheim, Germany, respectively. CMP-NeuNAc hydrolase was purified from rat serum and was a gift from Dr. S. Bouquelet. Authentic α-2,3 and α-2,6 sialyllactose were generously provided by Dr. G. Strecker.

Preparation of cells and homogenate. Spleen lymphocytes were prepared from six-week old Wistar rats as previously described {14}. Microscopic examination was routinely used to control the viability of cells by the Trypan Blue exclusion test. Homogenates were prepared from lymphocyte suspensions (10^9 cells/ml) in a cooled Potter-Elvejhem apparatus (3 x 10 strokes at 1,250 rpm).

Standard sialyltransferase assay. The incubation mixture contained 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.4, 0.154 M NaCl and 5 mM $MnCl_2$. Unless otherwise stated, standard assays (120 µl) contained 0,02 µCi of CMP-{^{14}C}NeuNAc, 2 x 10^7 cells and 1 mg of acceptors. Incubation was achieved at 30°C under a slow rotation for one hour. At the end of each incubation, the integrity of CMP-{^{14}C}-NeuNAc was controlled by submitting an aliquot fraction to descending paper chromatography in the following solvent (A) : pyridine, ethyl acetate, glacial acetic acid, water (5 : 5 : 1 : 3) {15}.

Determination of radioactivity incorporated on endogenous and exogenous acceptors. Radioactivity bound to endogenous acceptors was measured after phosphotungtic acid precipitation as previously described

{14}. When the high molecular weight acceptor was used radioactivity incorporated on the acceptor was measured by the difference between two assays one without exogenous acceptor. When lactose was used as the low molecular weight acceptor, low-speed supernatant of the incubation medium was spotted on Whatman 3 MM paper and labelled sialyllactose was separated from CMP-{^{14}C}NeuNAc and {^{14}C}NeuNAc by paper chromatography in the solvent system A as above, which allows separation of the α-2,3 and α-2,6 isomers of sialyllactose {16}. A control experiment was carried out simultaneously by omitting lactose. Sialyllactose was further eluted free of precursor and precursor degradation products and chromatographed together with authentic α-2,3 and α-2,6 sialyllactose.

Purification of the inhibitor. After homogenization of the cells, the 150.000 x g supernatant {12} was successively passed through Sephadex G-50, G-25 and G-10 columns equilibrated with 0.154 M NaCl in 0,1 M sodium cacodylate pH 7.4. An aliquot volume (60 µl) of each fraction was tested for its inhibitory effect in the standard sialyltransferase assay. Further identification of the inhibitor was achieved by paper chromatography using two different solvent systems : systeme (A) {15} and system (B) : isobutyric acid, concentrated ammonia, water (66 : 1 : 33) {17} and by high voltage paper electrophoresis in the following buffer : pyridine, glacial acetic acid, water (3 : 1 : 387) pH 5.4. After chromatography or electrophoresis, paper strips were cut along the migration path and products were eluted with 0,154 M NaCl, 0,1 M sodium cacodylate pH 7.4 and again used to check their inhibitory effect in the sialyltransferase test.

Proteolytic treatment of the inhibitor : The susceptibility to proteolytic enzymes was tested in two ways on aliquot fractions of the inhibitor after the Sephadex G-10 purification step. In one procedure digestion was performed with 1 unit of insolubilized papain at 37°C for 1, 4, 8 and 18 h. Insolubilized enzyme was discarded by low-speed centrifugation and supernatant was tested for its inhibitory effect. In the second procedure, 2 units of pronase were used and incubation was performed at 37°C, in 0,02 M calcium acetate. After 24 h and 48 h digestion, the incubate was passed through a Sephadex G-25 column and each fraction was tested for the inhibitory effect. In each case, control experiments omitting either proteolytic enzyme or inhibitor fraction were run simultaneously.

CMP-NeuNAc hydrolase treatment of the inhibitor : the inhibitory fraction obtained after the Sephadex G-10 purification step was treated with CMP-NeuNAc hydrolase purified from rat serum, in the sodium cacodyla buffer. The incubation was achieved at 37°C for 16 hours to obtain a complete degradation of the CMP-NeuNAc as monitored by the degradation of CMP-{^{14}C}NeuNAc added to the medium as internal marker in an aliquot fraction. The enzyme was further removed from the medium by passing throu a Sephadex G-25 column. Fractions were tested for their inhibitory effect described above using as control a similar Sephadex G-25 chromatography of the inhibitor which has been incubated in the same conditions but without CMP-NeuNAc hydrolase.

RESULTS AND DISCUSSION

A) Purification and identification of the inhibitor

In sialyltransferase assays using varying proportions of intact and broken cells, the quantity of radioactive sialyl residues transferred to endogenous acceptors decreases as the proportion of broken cells increases (Fig. 1 A). Compared to whole cells, the lower sialyltransferase activity observed with broken cells had also been mentionned by other authors {7, 18} but no explanation was given.

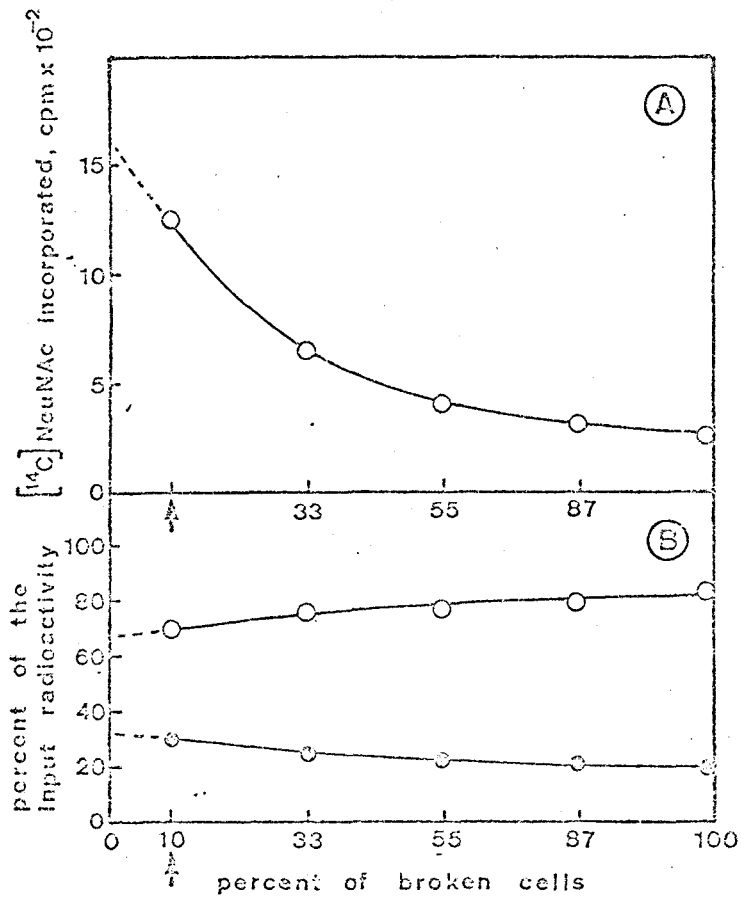


Fig. 1 : Simultaneous studies of the incorporation of {^{14}C}NeuNAc into endogenous acceptors and of the CMP-{^{14}C}NeuNAc degradation as a function of the percentage of broken cells : Mixture of known proportions of intact and broken cells were incubated with CMP-{^{14}C}NeuNAc in the standard conditions. Arrow indicates the percentage of broken cells in the stock suspension of whole cells as judged by the Trypan Blue exclusion test.
A) Incorporation of {^{14}C}NeuNAc into endogenous acceptors (○——○).
B) CMP-{^{14}C}NeuNAc integrity (○——○) and free {^{14}C}NeuNAc appearance (○——○).

This inhibitory effet is recovered in the 150 000 x g supernatant of lymphocyte homogenate and appears to be heat labile {12}. This crude inhibitory fraction was purified by the gel filtration technique. Fig. 2 shows a typical pattern observed on passing the supernatant through a Sephadex G-50 column. The active fraction was recovered at the $V_o + V_i$

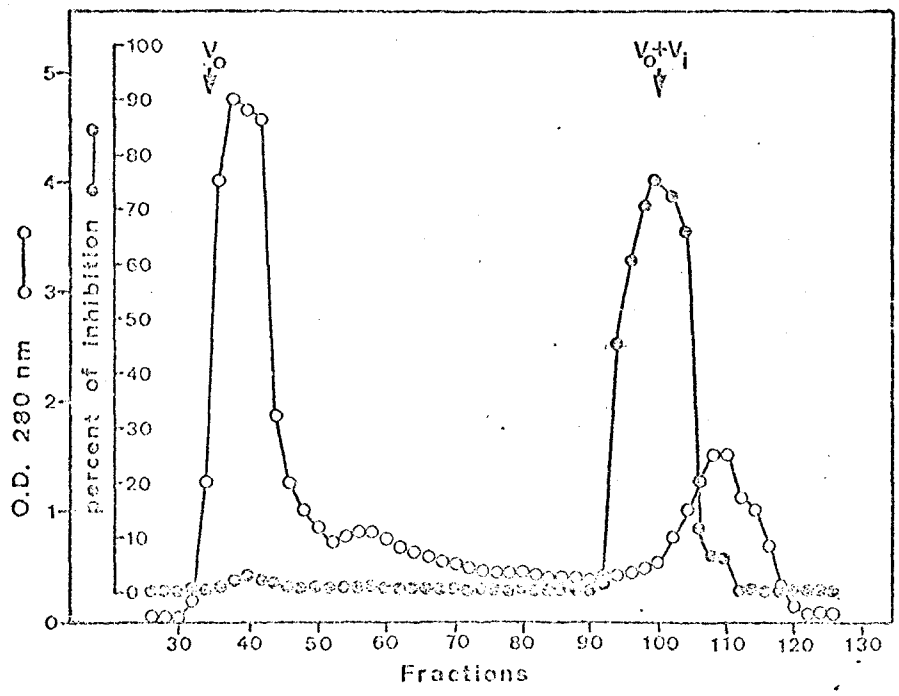


Fig. 2 : Gel filtration behavior of the sialyltransferase inhibitor extracted from lymphocyte homogenate : 10 ml of the 150,000 g supernatant were put on a 5 cm x 110 cm Sephadex G-50 column ; flow rate : 80 ml/h ; volume of each fraction : 20 ml ; absorbance was measured at 280 nm (O—O). The inhibitory effect was assayed for each fraction and expressed as a percent of the activity measured without inhibitor (O—O).

volume. This was also the case for the further Sephadex G-25 and G-10 chromatographies allowing us to conclude that the inhibitory effect is due to a small molecular weight compound. This latter purified fraction was tested for its susceptibility to proteolytic enzymes using either papain or pronase as described in the experimental section. No difference was observed after either proteolytic treatment. At this stage the results may be summarized as follows : the inhibitory effect is due to a protease resistant, small molecular weight, heat-labile compound. As we checked that CMP-NeuNAc was resistant to the commercialized proteases

used, was completely degraded by heat treatment (100°C, 3 min) and has the same behaviour on Sephadex column chromatography as the "so-called" inhibitor, we postulated that the lower transfer activity observed in the presence of broken cells could be due to isotopic dilution of the CMP-{^{14}C}NeuNAc used as precursor in the sialyltransferase assay. Further identification was achieved by submitting the purified active fraction (after the Sephadex G-10 purification step) to paper chromatography in two different solvent systems (A and B) and to high voltage paper electrophoresis. Fig. 3 shows that in each case, the inhibitory

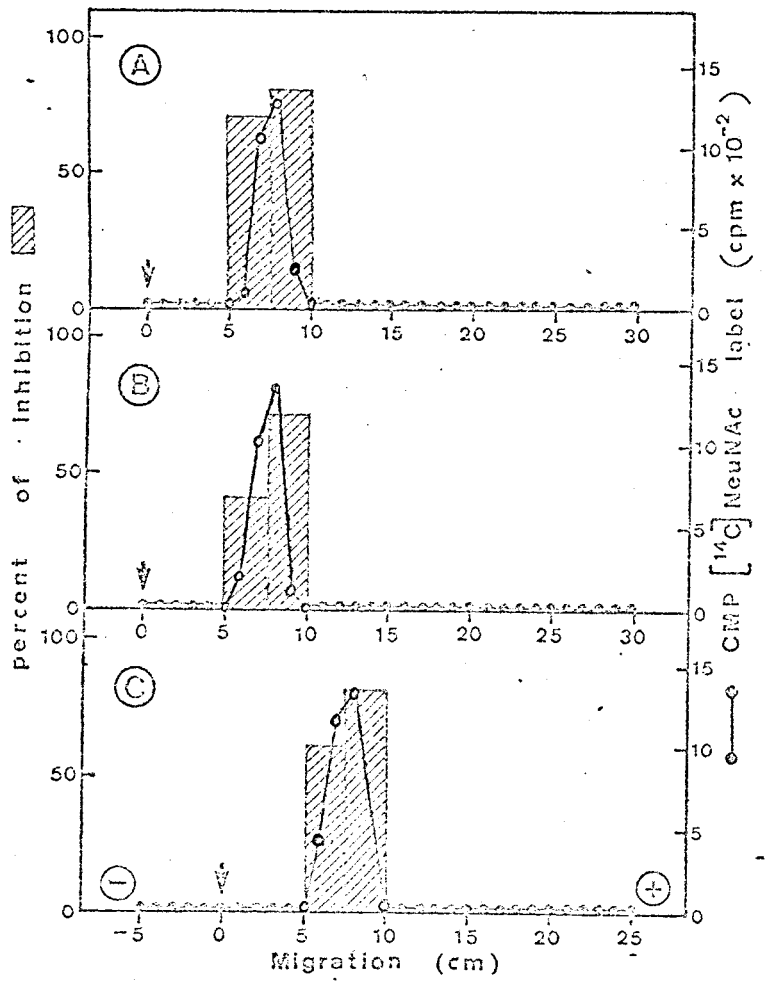


Fig. 3 : Characterization of the inhibitor of the sialyltransferase activity found in lymphocyte homogenate. A) Migration on paper chromatography using the solvent system A. B) Migration on paper chromatography using the solvent system B. C) Electrophoretic behavior using high voltage electrophoresis in pH 5.4 buffer. In each case the CMP-{^{14}C}NeuNAc was used as internal marker (o——o). The inhibitory effect in the sialyltransferase assay was tested after elution of 2.5 cm x 5 cm paper strip cut along the migration path. Result are expressed as a percent of the control activity without inhibitor.

effect is recovered in the fraction co-migration with the CMP-{^{14}C} NeuNAc used as a marker. In addition, treatment with purified CMP-NeuNAc hydrolase leads to the complete loss of the inhibitory effect. Thus, the previously observed inhibition appears to be due to endogenous CMP-NeuNAc released by broken cells. Considering Fig. 1 again, this unexpected isotopic dilution of radioactive precursor explains both the observed apparent inhibition of the sialyltransferase (Fig. 1A) and of the CMP-NeuNAc hydrolase (Fig. 1B). In addition, more important is the fact that the real sialyltransferase activity (expressed in pM of sialyl residue transferred) is different from the amount of {^{14}C} NeuNAc incorporated as each point should be corrected according to the level of unlabelled CMP-NeuNAc released. As this correcting factor increases as the proportion of broken cells increases, the corrected points could lead to a curve which extrapolates to zero, calling into question the presence of ectoenzyme activity.

As current methods for CMP-NeuNAc determination {19} are not sensitive enough to allow precise evaluation of the CMP-NeuNAc content in such assays, we developed a different approach to detect ectosialyltransferase activity using whole cell assays but taking into account that broken cells add both intracellular sialyltransferase and endogenous precursor.

B) New evidence for ectosialyltransferase activity using whole cells

To avoid a significant variation of the specific radioactivity of the precursor in the sialyltransferase assay, the transfer activity was measured in the presence of a quasi-constant and known amount of broken cells. Fig. 4 represents the {^{14}C}NeuNAc incorporated by mixtures of increasing amounts of whole cells (0 to 45 µl of a 10^9 cells/ml of stock solution containing 10 percent of broken cells) in the presence of 20, 35, 50 or 65 µl of broken cells (stock solution : 10^9 broken

cells/ml, Fig. 4A, 4B, 4C, and 4D respectively). The presence of increasi amounts of whole cells leads to an increased transfer of radioactive sialyl residues on endogenous acceptors, as illustrated by the difference between total incorporation and incorporation uniquely due to broken cells (Fig. 4, dotted lines). Since for each set of experiments, the additionnal bound {^{14}C}NeuNAc was measured for different amounts of broken cells i.e. for different specific radioactivities of the

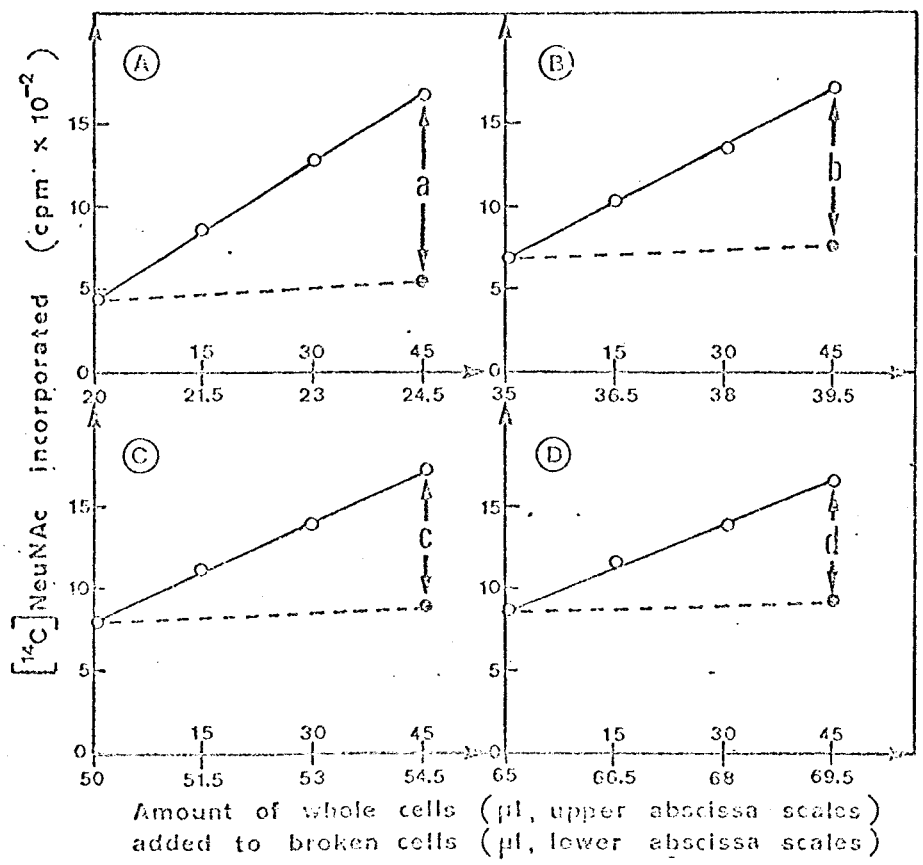


Fig. 4 : Incorporation of {^{14}C}NeuNAc into endogenous acceptors using mixture of broken cells with increasing amount of whole cells. The upper abscissa scales indicate the amount of whole cells (from 0 to 45 µl of a stock suspension of 10^9 cells/ml) which were incubated with the various amount of broken cells (20 µl, 35 µl, 50 µl and 65 µl of a stock suspension of 10^9 broken cells/ml for figure 4A, 4B, 4C and 4D respectively). In this experiment 10 percent of the whole cells in the stock suspension excluded Trypan Blue. The lower abscissa scales indicate the total amount of broken cells present in the final 120 µl assay. The values a, b, c, d indicate the additionnal {^{14}C}NeuNAc incorporated when intact cells (40.5 µl) are incubated with either 24.5 µl, 39.5 µl, 54.5 µl or 69.5 µl of homogenate. Dotted lines indicate the incorporation due to broken cells alone.

CMP-{^{14}C} NeuNAc, valid comparison of the increased transfer due to 40.5 µl of whole cells (values a,b,c,d on fig. 4) requires corrections for identical isotopic dilution. Assuming that this correcting factor is the same for homogenate alone and for mixtures of whole cells and an identical amount of homogenate, this correction is illustrated in table I. It gives comparative values of the enhancement of the transfer of sialyl residues due to the presence of whole cells for various amounts of homogenate. This enhancement may be due to ectoenzyme activities exhibited by whole cells and/or to the presence of additional cell surface acceptors for the intracellular sialyltransferases. To distinguish between these two possibilities, it is necessary to plot the enhancement of incorporation given by whole cells versus the various amounts of homogenate : either there is no ectoenzymatic activity, and thus the transfer activity is strictly proportional to the homogenate enzyme content (i.e. extrapolation of the curve to origin) or there is ectoenzyme activity and extrapolation to no broken cells reveals a significant transfer activity. This final extrapolation is illustrated in Fig. 5A which shows that intact lymphocytes alone exhibit a sialyltransferase activity. That is to say that the outer surfaces of these cells possess ectosialyltransferases. Furthermore, as the additional transfer of sialyl residues given by intact cells is constant whatever the amount of broken cells in the incubation medium, this suggests that the plasma membrane glycoconjugates are not acceptors for intracellular sialyltransferases.

C) Additional proofs for ectosialyltransferase activity toward exogenous acceptors

As we previously observed {11} that ectosialyltransferase activity toward exogenous acceptors was restricted to low molecular

TABLE I

Correction for identical isotopic dilution of the {^{14}C}NeuNAc transferred on whole cells : the sialyltransferase activity was assayed for mixture of intact cells (40.5 µl) with various amount of homogenate (24.5 µl, 39.5 µl, 54.5 µl and 69.5 µl) as indicated in the legend of Fig. 4. The corrective factor for identical isotopic dilution is obtained by assuming that a linear relationship should be observed between amount of homogenate and amount of {^{14}C}NeuNAc transferred.

Amount of homogenate in the incubation (µl)	A : {^{14}C}NeuNAc incorporated on endogenous acceptors by homogenate alone (cpm)	B : Corrected values for identical isotopic dilution (cpm)	Corrective factor B/A	Enhancement of the transfer of {^{14}C}NeuNAc residues by whole cells (40.5 µl) in the presence of homogenate * (cpm)	Corrected values for identical isotopic dilut using factor B/A (cpm)
24.5	539	539	1.00	1160	1160
39.5	770	869	1.13	950	1070
54.5	897	1199	1.34	826	1106
69.5	944	1529	1.62	720	1166

BUS LILLE

* These values are obtained from Fig. 4 as indicated by a, b, c, d.

weight acceptors, we investigated this peculiar property using this new approach. Fig. 5B shows the final extrapolation step obtained with lactose as low molecular weight acceptor and asialofetuin as high molecular weight acceptor. It clearly appears that the presence of intact cells does not enhance the transfert of sialyl residues to asialo-fetuin but leads to a significant transfer to lactose. It must be

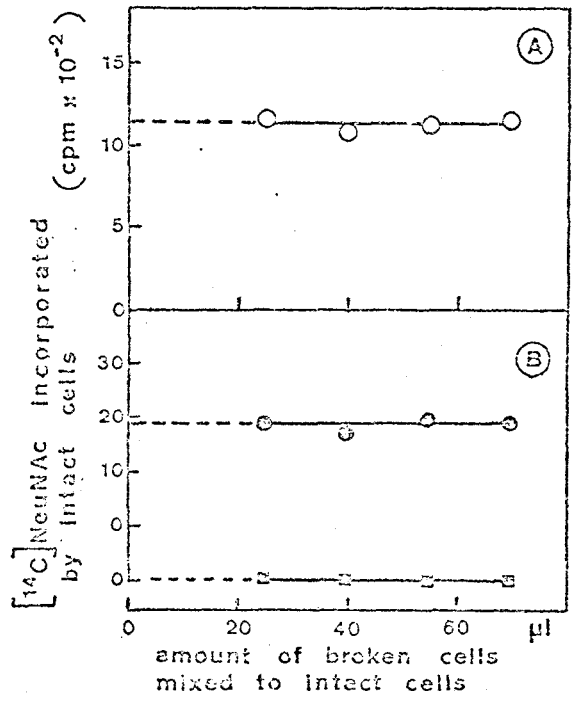


Fig. 5 : Variation of the incorporation of {^{14}C}NeuNAc by constant amount of whole cells when assayed in the presence of various amount of broken cells. The amount of {^{14}C}NeuNAc incorporated by whole cells are corrected for identical isotopic dilution as indicated in Table I and plotted versus the amount of broken cells. Extrapolation to zero give the intrinsec activity due to intact cells alone. A) Incorporation on endogenous acceptors (○——○). B) Incorporation on asialofetuin (□——□) and on lactose (⊗——⊗).

noted that, in our experimental conditions, the same product (α-2,3 sialyllactose only) is obtained by using whole cells as well as homogenate. Thus, this different experimental approach confirms that the sialyltransferase located at the outer surface of lymphocytes is not able to sialylate high molecular weight acceptor but is able to transfer sialyl residues to low molecular weight acceptors {11}.

CONCLUSIONS

Among the various causes of errors to detect ectoenzyme activity using incubations with whole cells, one of the most difficult to avoid is the presence of a small percentage of broken cells which could be responsible for all the transfer activity detected. To take into account the inevitable presence of broken cells, the easiest way is to use the method described by Struck and Lennarz plotting the transfer activity versus various mixtures of whole and broken cells and using extrapolation to zero percent broken cells for assigning transfer activity to ectoenzymes. However this method may be faulty if broken cells release endogenous precursor causing an isotopic dilution of the labelled precursor used in the assay. In this case, the radioactivi bound to acceptors does not reflect the real amount of transferred sialyl residues and furthermore the profile of the curve may be so modified that extrapolation to zero percent broken cells is no longer significant. We made this observation when testing ectosialyltransferase {12} and ectofucosyltransferase {20} activities with whole rat spleen lymphocytes. The decreasing radioactivity bound to endogenous acceptor with an increasing percentage of broken cells lead us to the detection of a heat-labile cytosoluble factor producing an inhibitory effect in

the sialyltransferase assay. In this paper, we assign the inhibition to the release of intracellular CMP-NeuNAc by broken cells causing an isotopic dilution of the labelled precursor. Thus, to have a valid test for ectosialyltransferase, we developed a new procedure based on the measurement of whole cell sialyltransferase activity in the presence of constant amount of broken cells i.e. a constant, thus comparative isotopic dilution. This technique permitted us to ascertain whether the sialyltransferase activity measured with whole cells was really due to ectoenzyme. Moreover, since first, a constant level of sialylation of the whole cells is observed whatever the amount of homogenate present in the incubate and second that ectosialyltransferase is not able to sialylate high molecular weight exogenous acceptors, it is suggested that in these in vitro assays, there is a compartmentation of sialyltransferase activity : the ectoenzyme and the intracellular enzyme endogenous activities being restricted to their own membrane acceptors. It is not possible to observe a trans-sialylation process between intracellular membranes and the plasma membrane. This appears to be of importance to further elucidate differences in the function of ectosialyltransferases and intracellular sialyltransferases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé n° 217 : Relations structure - fonction des constituants membranaires) and from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat de Recherche libre n° 78-1-1942). We are grateful to Dr. Stephane Bouquelet for his gift of CMP-NeuNAc hydrolase and to Dr. Gerard Strecker for his gift of neuraminyl lactoses. Bernard Hoflack received a fellowship from the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

REFERENCES

1. De Pierre, J.W. and Karnovsky, M.L. (1973) J. Cell. Biol. 56, 275-303
2. Porter, C.W. and Bernacki, R.J. (1975) Nature 256, 648-650
3. Weiser, M.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2542-2548
4. Grimes, W.J. (1973) Biochemistry 12, 990-996
5. Datta, P. (1974) Biochemistry 13, 3987-3991
6. Painter, R.G. and White A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 837-841
7. Cerven, E. (1977) Biochim. Biophys. Acta 467, 72-85
8. Shur, B.D. and Roth, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 473-512
9. Deppert, W. and Walter, G. (1978) J. Supramol. Struct. 8, 19-39
10. Keenan, T.W. and Morré, D.J. (1975) FEBS Lett. 55, 8-13
11. Verbert, A., Cacan, R., Debeire, P. and Montreuil, J. (1977) FEBS Lett. 74, 234-288
12. Cacan, R., Verbert, A., Hoflack, B. and Montreuil, J. (1977) FEBS Lett. 81, 53-56
13. Struck, D.K. and Lennarz, W.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2511-2519
14. Cacan, R., Verbert, A. and Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102-106
15. Fischer, F.G. and Nebel, H.G. (1955) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 302, 10-15
16. Hudgui, R.L. and Schachter, H. (1972) Can. J. Biochem. 50, 1024-1028
17. Turba, F. and Enenkel, H.J. (1951) Die Natur wissenschaften 8, 188-190
18. Patt, L.M. and Grimes, W.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4157-4165
19. Bauer, C.H., Vischer, P., Grünholz, H.J. and Reutter, W. (1977) Cancer Res. 37, 1513-1518
20. Hoflack, B., Cacan, R. and Verbert, A. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 1-6.

IV - ETUDE DE L'ECTOFUCOSYLTRANSFERASE

ARTICLE VI : Mise en évidence de deux activités fucosyltransférasique à la surface du lymphocyte de Rat

Appliquant les critères qui nous avaient servis à détecter les activités ectogalactosyltransférasiques et ectosialyltransférasiques nous avons recherché la présence d'ectofucosyltransférases à la surface du lymphocyte splénique de Rat. L'article VI montre qu'il existe une grande analogie avec les activités ectosialyltransférasiques. Les enzymes semblent en effet très actifs dans la glycosylation des accepteurs endogènes dans un processus de cis-glycosylation. Lorsque l'incubation est effectuée en présence d'accepteurs exogènes, seuls les accepteurs de faible masse moléculaire (galactose, di N-acétylchitobiose) arrivent jusqu'au site actif des enzymes ce qui suggère qu'ils sont enfouis profondément dans la membrane. Ces enzymes sont inhibés par de très faibles concentrations de GDP, produit de la réaction, et montrent vraisemblablement pour cette raison une cinétique très courte. Enfin on retrouve sur la surface cellulaire à la fois les deux enzymes trouvés sur les membranes intracellulaires c'est-à-dire la GDP-fucose : galactoside fucosyltransférase (sélectivement inhibée par la N-éthylmaléimide) et la GDP-fucose : N-acétyl glucosaminide fucosyltransférase ; ainsi que le type d'accepteur correspondant à chacun de ces enzymes. Ces deux types d'enzymes pourraient être impliqués, comme l'ectosialyltransférase, dans la réparation des glycoconjugués membranaires.

Eur. J. Biochem. 88, 1–6 (1978)

Occurrence of Two Fucosyltransferase Activities at the Outer Surface of Rat Lymphocytes

Bernard HOFLACK, René CACAN, and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I
(Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique No. 217), Villeneuve d'Ascq

(Received January 27, 1978)

To demonstrate the existence of ectofucosyltransferase activities on the outer surface of rat lymphocytes, we measured fucosyltransferase activities on whole cells using procedures enabling us to exclude the possibility of misleading results due to precursor hydrolysis and intracellular utilization of the free fucose, and to take into account the contamination by intracellular enzymes freed by the small percentage of broken cells. The described ectofucosyltransferases are able to catalyze the transfer of fucosyl residues from GDP-fucose to the endogenous membrane acceptors but the transfer activity towards exogenous acceptors is restricted to low molecular weight compounds. Use of galactose and di-*N*-acetylchitobiose as exogenous acceptors and concomitant study of the specific inhibition by *N*-ethylmaleimide enabled us to detect both types of ectofucosyltransferases: a GDP-fucose : galactoside ectofucosyltransferase and a GDP-fucose : *N*-acetylglucosaminide ectofucosyltransferase.

The presence of fucosyl residues has been demonstrated in various types of membrane glycoconjugates of biological importance. For example, fucose has been found as a terminal residue attached to β-galactosyl residues of glycoconjugates confering blood-group H-specificity [1], and as a branched residue attached to the asparagine-linked *N*-acetylglucosamine residue of asparagine – *N*-acetylglucosamine-type glycoproteins as in the mouse histocompatibility-2 alloantigen [2] and immunoglobulins [3]. Recently, it has been proved that two different fucosyltransferases were involved in the transfer of fucose from GDP-fucose to each type of acceptor, either to a β-*N*-acetylglucosaminyl residue or to a terminal galactosyl residue [4]. Although during the past few years biochemical evidence for ectoglycosyltransferases has been accumulating (for review see [5]), few reports concerned ectofucosyltransferases and their possible involvement in the fucosylation of the membrane components [6, 7].

The methodology we developed to prove the presence of ectoglycosyltransferases [8–10] has been applied, in this work, to detect ectofucosyltransferases on whole lymphocytes avoiding the causes of errors pointed out by Keenan and Morré [11]. These ectofucosyltransferases are able to transfer fucose to low molecular weight acceptors and to their nearby membranous acceptors. However, this transfer reaction is not possible with macromolecular acceptors contrary to observations with intracellular enzymes. In addition, using different types of low molecular weight acceptors and the selective inhibition of the galactoside fucosyltransferase by *N*-ethylmaleimide [12] we demonstrated the presence of two ectofucosyltransferase activities: a GDP-fucose : galactoside fucosyltransferase and a GDP-fucose : *N*-acetylglucosaminide fucosyltransferase.

Abbreviation. GDP-Fuc, guanosine diphospho-L-fucose.
Enzyme. β-Galactosidase (EC 3.2.1.23).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade. All sugars were of the D configuration except the L-fucose. GDP-[^{14}C]fucose (specific activity 89 Ci/mol) was obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, England). L-Fucose, D-galactose, GMP, GDP, UMP, *N*-ethylmaleimide and fetuin were purchased from Sigma (St Louis, U.S.A.). β-Galactosidase from Jack bean was a gift from Dr G. Spik. Di-*N*-acetylchitobiose was obtained from l'Industrie Biologique Française (Clichy, France).

Preparation of Cells and Homogenate

Spleen lymphocytes were prepared from six-week-old Wistar rats as previously described [8]. Homo-

genates were prepared from a lymphocyte suspension (6×10^8 cells/ml) in a cooled Potter-Elvejhem apparatus (3×10 strokes at 1250 rev./min).

Preparation of Macromolecular Acceptors

Fetuin was desialylated by mild acid hydrolysis (0.005 M H_2SO_4, 100 °C, 30 min). The asialofetuin was further treated with β-galactosidase purified from Jack bean and the enzyme was removed by passing through a column of Ultrogel AcA-44. Effective desialylation (complete) and degalactosylation (about 50% galactosyl residues removed) were checked by gas-liquid chromatography.

Standard Fucosyltransferase Assays

The incubation mixture contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM fucose, 5 mM UMP, and 5 µM GDP-[^{14}C]-fucose i.e. an average value of 200 counts $\times$ min^{-1} $\times$ pmol^{-1}. For a final volume of 100 µl, a standard assay solution contained 3×10^7 cells and 1 mg of acceptors. Incubation was at 30 °C for 10 min.

Analysis of [^{14}C]Fucose Incorporated on Cells and on Macromolecular Acceptors

After incubation, cells were separated from exogenous macromolecular acceptors by low-speed centrifugation before acid precipitation. As we had observed adsorption of labelled GDP-fucose on cells and macromolecular acceptors (about one-third of the enzymatically incorporated radioactivity) when direct addition of trichloroacetic acid or phosphotungstic acid had been used, we developed a procedure to eliminate this background radioactivity. After separation, cells or macromolecular acceptors were first diluted 25 times with cold 0.154 M NaCl, precipitated with trichloroacetic acid (10% final) and desorption was completed by increasing the ionic strength using NaCl to give a final concentration of 2 M. The acid-precipitable material was collected on a glass fibre filter (Whatman GF 83) and extensively washed with 5% trichloroacetic acid and then with cold ethanol. The radioactivity was determined by counting in scintillation liquid. In these conditions, adsorption was reduced to less than 1% of the enzymatically incorporated label as illustrated in Fig. 1.

Analysis of [^{14}C]Fucose Incorporated into Glycoproteins or Glycolipids

Glycolipids were extracted from the acid-precipitable material by solubilization in chloroform/methanol mixture as described by Patt and Grimes [13] for cell surface glycolipids and glycoproteins. Following

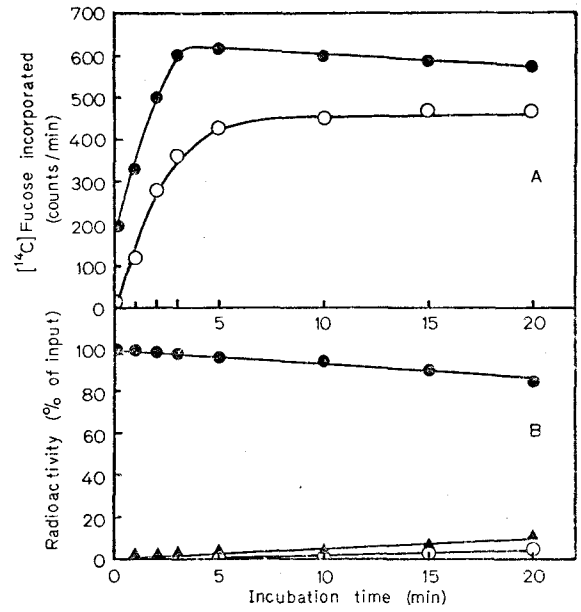


Fig. 1. *Kinetic studies of the transfer of [^{14}C]fucose to the cells from GDP-[^{14}C]fucose and concomitant analysis of nucleotide sugar degradation.* Incubations were performed in the standard conditions at 30 °C with 3×10^7 cells in a final volume of 100 µl, in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 containing 5 µM GDP-[^{14}C]-fucose, 5 mM UMP and 1 mM fucose. (A) Total radioactivity bound to the cells after trichloroacetic acid precipitation (●——●). (B) Radioactivity bound to the cells after desorption of radioactive precursors by high saline treatment and washings as indicated under Materials and Methods (○——○). (B) GDP-Fuc integrity (●——●), fucose 1-phosphate (▲——▲) and appearance of free fucose (○——○)

incubations, cells were precipitated as described above. The precipitated material was collected by centrifugation and the pellet was washed twice with 5% trichloroacetic acid and then by successive addition of water until the supernatant contained less than 100 counts $\times$ min^{-1}. The washed pellet was extracted three times with 2 ml of chloroform/methanol (2/1) and the extractions were pooled and dried in scintillation vials for counting. The extracted pellet was suspended in 1 ml of 1 M NH_4OH and heated to 70 °C overnight. Proteins solubilized by this procedure were transferred to scintillation vials and counted.

Analysis of [^{14}C]Fucose Incorporated in Low Molecular Weight Acceptors and of the Precursor Degradation Products

When low molecular weight acceptors were used, fucosylated products were separated from precursor and precursor degradation products (GDP-[^{14}C]fucose, [^{14}C]fucose 1-phosphate and [^{14}C]fucose) by paper chromatography in the following solvent [14]: ethyl acetate/pyridine/glacial acetic acid/water (5/5/1/3). Fucosylated acceptors were further eluted free of degradation products and chromatographed together with unlabelled sugars.

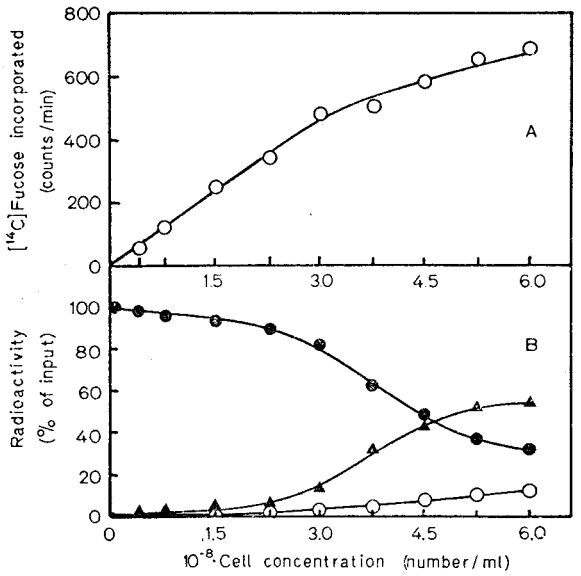


Fig. 2. *Effect of the cell concentration on the transfer of [^{14}C]fucose to the cells from GDP-[^{14}C]fucose and concomitant analysis of nucleotide sugar degradation.* Incubations were performed at 30 °C for 10 min in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4, containing 5 µM GDP-[^{14}C]fucose, 5 mM UMP and 1 mM fucose in a final volume of 100 µl. (A) Transfer of radioactive fucose to the cells (○——○). (B) GDP-fucose integrity (●—— ●), fucose 1-phosphate (▲——▲) and appearance of free fucose (○——○)

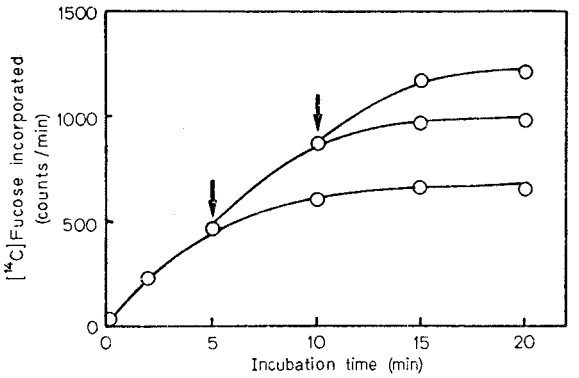


Fig. 3. *Kinetic studies of the transfer of [^{14}C]fucose to the cells from GDP-[^{14}C]fucose.* Incubations were performed in the standard conditions at 30 °C with a final concentration of 3×10^8 cells/ml in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 with 5 mM UMP and 1 mM fucose, in a final volume of 100 µl containing 0.5 nM of GDP-[^{14}C]fucose. Arrows indicate new additions of 0.5 nM of GDP-[^{14}C]Fuc after 5 and 10 min

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the Conditions for Measurement of Ectofucosyltransferase Activities

In our previous studies on ectoglycosyltransferases [8–10], we pointed out that precursor degradation by plasma membrane nucleotide-pyrophosphatase(s) and phosphatase(s) leads to the formation of labelled free sugar which may enter the cells and contribute to a non-enzymatic label of these cells. To measure a real enzymatic glycosylation of the plasma membrane acceptors from nucleotide sugars, the formation and entry of free radioactive sugar have to be reduced to a negligible level. For incubation with whole cells this can be achieved by addition of nucleoside monophosphates [15], phloridzin and an excess of unlabelled sugar. In the case of fucosyltransferase, we determined that the UMP concentration had to be raised to 5 mM to inhibit the degradation of GDP-fucose without affecting the transfer activity. Furthermore, the addition of UMP lowered the amount of free fucose generated during the incubation to less than 10 % of the input radioactivity in standard conditions. In addition, a 1000-fold excess of unlabelled fucose (1 mM) was sufficient, without any need for phloridzin, to reduce the entry of labelled fucose into the cells to less than 0.1 % of the extracellular radioactive fucose.

Taking these conditions into account, we studied the optimal cell concentration for the measurement of the ectofucosyltransferase activity with suspensions of intact lymphocytes. Fig. 2 shows that, up to 3.10^8 cells/ml, the radioactivity bound to the cells was proportional to the number of cells i.e. the enzyme concentration. As, in this concentration range, no significant amount of free radioactive fucose was formed during the 10-min reaction, the GDP-[^{14}C]fucose was the only donor of fucose indicating a fucosyltransferase activity exhibited by whole cells. At cell concentrations higher than 3.10^8 cells/ml, the transfer reaction was still observed but the degradation of GDP-[^{14}C]fucose led to a decrease of the slope. In the further assays, cell concentration was adjusted to 3.10^8 cells/ml.

Kinetic Studies of the Ectofucosyltransferase Reaction

Fig. 1A shows the time dependence of the ectofucosyltransferase activity. The transfer reaction reached a plateau after 5 min of incubation although the precursor integrity was preserved far over this time (Fig. 1B). This result could be explained if either the enzyme was no longer active or if there were no more membranous acceptors available after this reaction period. However, experiments described in Fig. 3 indicate that when further precursor was added after 5 min, the reaction started again with the same initial velocity to reach a plateau which could be again overcome by a new addition of precursor. Consequently, neither the inactivation of the enzyme nor the lack of acceptors can explain the plateau of the reaction after 5 min of incubation. The kinetics of the reaction rather indicate that an inhibitor was produced during the reaction and that it could be displaced by the substrate. Fig. 4 shows that GDP, a product of the transfer reaction, exhibited an inhibitory effect and is 1000-times more effective than GMP. This fact is in a good agreement with studies of Bella and Kim [16] who proved that GDP is a competitive inhibitor of solu-

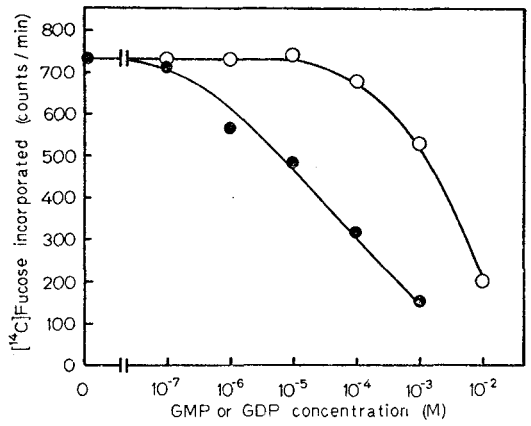


Fig. 4. *Effect of various concentrations of GDP or GMP on the transfer activity.* Incubations were performed in the standard conditions at 30 °C for 10 min with a final concentration of cells of 3×10^8 cells/ml in a final volume of 100 µl in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 with 10 µM GDP-[^{14}C]fucose, 5 mM UMP and 1 mM fucose. A logarithmic scale is used for the GDP (●——●) and GMP (○——○) concentrations

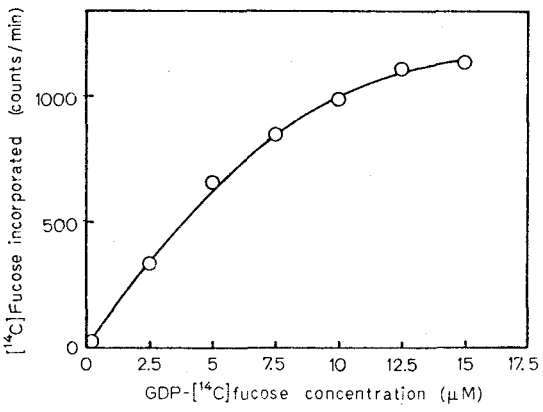


Fig. 5. *Effect of the GDP-[^{14}C]fucose concentration on the transfer of [^{14}C]fucose to the cells.* Incubations were performed at 30 °C for 10 min with 3×10^7 cells in a final volume of 100 µl, in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 containing 5 mM UMP, 1 mM fucose and increasing concentrations of GDP-[^{14}C]fucose

bilized intestinal fucosyltransferase. Consequently, the plateau we obtained in kinetic studies of ectofucosyltransferase could be explained by a retroinhibition by the GDP produced during the reaction.

Maximal incorporation (around 1000 counts $\times min^{-1}$) of fucosyl residues in the membranous acceptors could be obtained for an input of 1.5 nM of GDP-[^{14}C]fucose per 3×10^7 cells (Fig. 5). These conditions led to an estimate of 100000 newly bound fucosyl residues per cell. These fucosyl residues were bound to glycolipids and glycoproteins in an average proportion of 40 % and 60 % respectively as measured after chloroform/methanol extraction of the total acid-precipitable material.

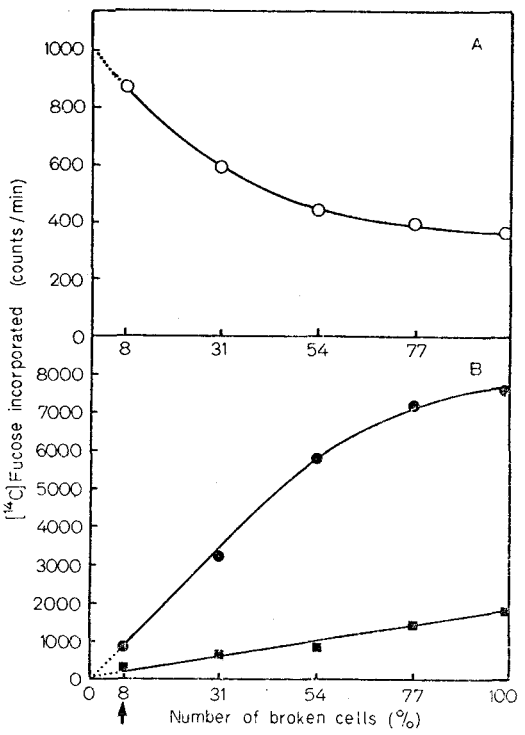


Fig. 6. *Fucosyltransferase activity as a function of the percentage of broken cells present in an incubation.* Incubations were performed at 30 °C for 10 min in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 containing 10 µM GDP-[^{14}C]fucose, 5 mM UMP and 1 mM fucose. Mixtures of known proportion of intact and broken cells were added to the incubation medium. In the experiment 92 % of the stock suspension of cells excluded trypan blue (arrow). (A) Incorporation of radioactive fucose on endogenous acceptors (○——○). (B) Incoporation of radioactive fucose on asialofetuin (■——■) and asialo-agalactofetuin (●——●). Each assay contained 1 mg of exogenous macromolecular acceptor

Evidence for Ectofucosyltransferase Activities

By avoiding errors due to precursor hydrolysis, the above experiments define the optimal conditions for measuring fucosyltransferase activities in incubations with whole cells. However, the assignment of the fucosyltransferase activity to ectoenzyme is complicated by the presence of a certain percentage of broken cells. To determine whether the measured activities were due to broken cells, mixtures containing definite proportions of intact and broken cells were incubated with GDP-[^{14}C]fucose as recommended by Struck and Lennarz [17]. Fig. 6A shows that the radioactivity bound to endogenous acceptors decreased while the proportion of broken cells increased. This phenomenon cannot be accounted for by an increased degradation of precursor by broken cells as was revealed by the GDP-fucose integrity checked after incubation. This reduced incorporation of fucosyl residues by broken cells is under investigation and appears, up to now, to be a similar phenomenon to the one we observed in the case of ectosialyltransferase [18]. Whatever the case may be, it is important that

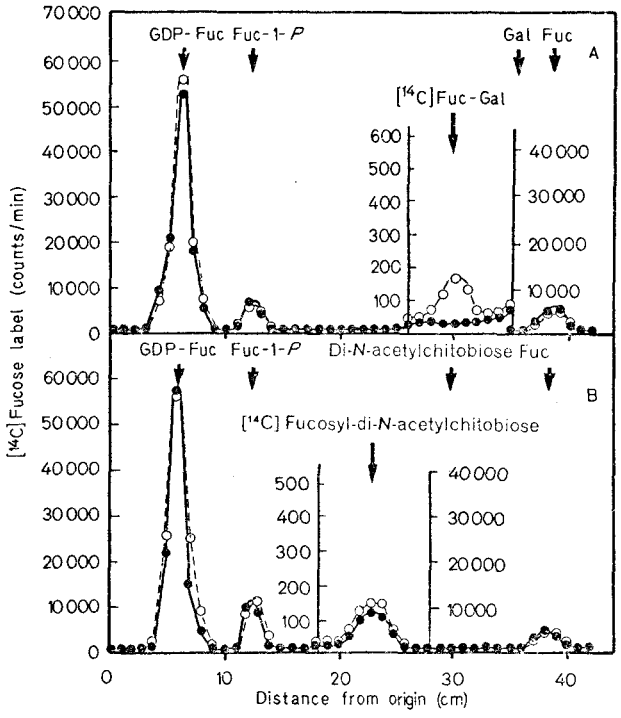


Fig. 7. *Chromatography of the products of a transfer reaction of radioactive fucose from GDP-[^{14}C]fucose to low molecular weight acceptors.* Whole cells incubations were performed at 30 °C for 10 min in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 containing 10 µM GDP-[^{14}C]fucose and 5 mM UMP. After incubation, cells and acceptors were separated by low-speed centrifugation and the supernatant was submitted to paper chromatography in the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5/5/1/3). (A) 1 mg of galactose was added to the incubation medium without (○——○) or with 5 mM *N*-ethylmaleimide (●——●). (B) 1 mg of di-*N*-acetylchitobiose was added to the incubation medium without (○——○) or with 5 mM *N*-ethylmaleimide (●——●). Gal, galactose; Fuc, fucose; Fuc-1-*P*, fucose 1-phosphate; Fuc-Gal, fucosyl galactose

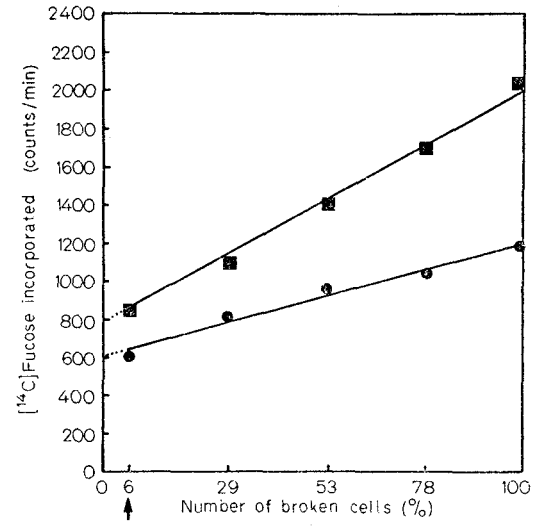


Fig. 8. *Fucosyltransferase activity measured with low-molecular-weight acceptors as a function of the percentage of broken cells present in an incubation.* Incubations were performed at 30 °C for 10 min in the cacodylate/NaCl/$MgCl_2$ buffer pH 7.4 containing 10 µM GDP-[^{14}C]fucose and 5 mM UMP. Mixtures of known proportions of intact and broken cells were added to the incubation medium. In this experiment 94 % of the stock suspension of cells excluded trypan blue (arrow). Each assay contained 1 mg of galactose (■——■) or di-*N*-acetylchitobiose (●——●)

extrapolation to 100 % intact cells reveals a significant ectofucosyltransferase activity.

Study of the Fucosylation of Macromolecular Acceptors

To distinguish between GDP-fucose : galactoside fucosyltransferase and GDP-fucose : *N*-acetylglucosaminide fucosyltransferase activities, the use of exogenous acceptors is required. Asialofetuin and asialoagalactofetuin are useful to demonstrate these two activities as were shown by Jabbal and Schachter [19]. These two macromolecules are good acceptors for intracellular enzymes as shown by the transfer of [^{14}C]fucosyl residues catalyzed by cell homogenate (Fig. 6B; 100 % broken cells). However, extrapolation to zero percent broken cells indicates no detectable ectofucosyltransferase activities measured with these macromolecular acceptors. As has been postulated for ectosialyltransferase [10], ectofucosyltransferase could be rather buried in the membrane and its accessibility to exogenous acceptors restricted to those of low molecular weight.

Fucosylation of Low-Molecular-Weight Acceptors to Reveal Two Ectofucosyltransferase Activities

A comparative study of the incorporation of [^{14}C]-fucosyl residues in low-molecular-weight acceptors required a simple separation procedure to avoid any loss of material. Galactose and di-*N*-acetylchitobiose were chosen as acceptors since their fucosylated derivatives separate well from precursor degradation products in the one-dimensional paper chromatography system described above (see Fig. 7). By this procedure, such a comparative study of the transfer activity in incubation mixtures containing various proportions of intact and broken cells (Fig. 8) indicates that whole cells (extrapolation to zero percent broken cells) exhibit ectofucosyltransferase activities toward low molecular weight acceptors. In addition, this data shows that lymphocytes possess both fucosyltransferase activities on their outer surface: galactoside fucosyltransferase and *N*-acetylglucosaminide fucosyltransferase activities. It has been recently shown, in the case of plasma fucosyltransferases [12] that inhibition by *N*-ethylmaleimide could be used to distinguish between these two activities since the galactoside fucosyltransferase is the only one affected by *N*-ethylmaleimide. Preliminary studies indicate that, in our case, optimal inhibition was obtained in the presence of 5 mM *N*-ethylmaleimide in the incubation medium. Fig. 7 shows the

chromatographic pattern of [^{14}C]fucose-labelled products obtained after whole cell incubation with GDP-[^{14}C]fucose in standard conditions with either galactose (Fig. 7A) or di-*N*-acetylchitobiose (Fig. 7B) as acceptors and measured with or without 5 mM *N*-ethylmaleimide. It reveals that *N*-ethylmaleimide completely abolishes the transfer of fucosyl residues to galactose but it only partially affects the transfer on *N*-acetylglucosaminyl residues (20% inhibition). These results confirm for ectofucosyltransferases the observations of Chou et al. [12] with plasma fucosyltransferases, and, moreover, enable us to conclude that the rat spleen lymphocytes possess the two fucosyltransferase activities on their outer surface.

CONCLUSION

Taking into account the misleading effects of precursor hydrolysis, of free sugar entry into the cell and of contamination by broken cells, our results clearly prove that ectofucosyltransferase activities are present on intact lymphocytes. These ectofucosyltransferases are able to transfer fucose from GDP-fucose to endogenous membranous glycolipid and glycoprotein acceptors to the extent of 100000 fucosyl residues per cell as estimated by the specific radioactivity of [^{14}C]fucose. This number is in the range that has been observed for ectogalactosyltransferase [9] and for ectosialyltransferase [18]. However, these ectofucosyltransferases are not able to transfer fucosyl residues to macromolecular exogenous acceptors although the lymphocyte possesses intracellular enzymes which are capable of doing so. This property may indicate that enzymes of the cell surface and of the intracellular membranes are different, but it may also be the case that the same enzyme is in different environments on cytomembranes and on plasma membranes. This peculiar property has already been observed for ectosialyltransferase [10] but not for ectogalactosyltransferase [8].

As the occurrence of two fucosyltransferases in microsomal membranes has been well defined [4, 19], it was worthwhile examining whether these two activities could be recovered on the plasma membrane. As the use of different macromolecular acceptors was not possible in our case, our investigation was restricted to low molecular weight acceptors. We chose galactose and di-*N*-acetylchitobiose to demonstrate the GDP-fucose:galactoside fucosyltransferase and GPD-fucose : *N*-acetylglucosaminide fucosyltransferase activities respectively. To distinguish these two activities we used the selective inhibition of the galactoside fucosyltransferase observed with *N*-ethylmaleimide. The results prove the presence of the two ectofucosyltransferase activities on the outer surface of rat lymphocytes.

This research was supported by grants from the *Centre National de la Recherche Scientifique* (*Laboratoire Associé* number 217: *Biologie Physico-chimique et Moléculaire des Glucides Libres et Conjugués*) and by the *Commissariat à l'Energie Atomique*. We thank Dr B. Fournet for the gas-liquid chromatography analysis. We are indebted to Dr G. Spik for her gift of β-galactosidase. Bernard Hoflack received a fellowship from the *Ligue National Française contre le Cancer*. We are very thankful to the director of this laboratory, Professor Jean Montreuil, for his constant interest during the course of this investigation and for providing research facilities.

REFERENCES

1. Schenkel-Brunner, H., Chester, M. A. & Watkins, W. M. (1972) *Eur. J. Biochem. 30*, 269–277.
2. Nathenson, S. G. & Muramatsu, T. (1971) in *Glycoproteins of Blood Cells and Plasma* (Jamieson, G. A. & Greenwalt, T. J., eds) pp. 245–262, J. B. Lippincott, Philadelphia.
3. Baenziger, J. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem. 249*, 7270–7231.
4. Wilson, J. R., Williams, D. & Schachter, H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 72*, 909–916.
5. Shur, B. D. & Roth, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta. 415*, 473–512.
6. Weiser, M. M. (1973) *J. Biol. Chem. 248*, 2542–2548.
7. McLean, R. J. & Bosmann, H. B. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 72*, 310–313.
8. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) *FEBS Lett. 63*, 102–106.
9. Verbert, A., Cacan, R. & Montreuil, J. (1976) *Eur. J. Biochem. 70*, 49–53.
10. Verbert, A., Cacan, R., Debeire, Ph. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett. 74*, 234–238.
11. Keenan, T. W. & Morré, D. J. (1975) *FEBS Lett. 55*, 8–13.
12. Chou, T. H., Murphy, C. & Kessel, D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 74*, 1001–1006.
13. Patt, L. M. & Grimes, W. J. (1974) *J. Biol. Chem. 249*, 4157–4165.
14. Fischer, F. G. & Nebel, H. G. (1955) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 302*, 10.
15. Bischoff, E., Tran-Thi, T. A. & Decker, K. F. A. (1975) *Eur. J. Biochem. 51*, 353–361.
16. Bella, A. & Kim, Y. S. (1971) *Arch. Biochem. Biophys. 147*, 753–761.
17. Struck, D. K. & Lennarz, W. J. (1976) *J. Biol. Chem. 251*, 2511–2519.
18. Cacan, R., Verbert, A., Hoflack, B. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett. 81*, 53–56.
19. Jabbal, I. & Schachter, H. (1971) *J. Biol. Chem. 246*, 5154–5161.

B. Hoflack, R. Cacan, and A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technique de Lille I, Boite postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

V - CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches sur les ectoglycosyltransférases nous ont permis de mettre en évidence, sans ambiguité, des activités ectogalactosyl-, ecto-sialyl- et ectofucosyltransférasiques à la surface des lymphocytes spléniques de Rat. Cette étude a été réalisée avec des cellules entières et en tenant compte des causes d'erreurs suivantes :

1 : phagocytose de l'accepteur exogène qui conduit à une glycosylation de l'accepteur par les glycosyltransférases intracellulaires;

2 : hydrolyse du précurseur par les ectopyrophosphatases qui aboutit à la libération de sucre libre radioactif entrant dans la cellule. La radioactivité liée aux cellules est dans ce cas sans rapport avec une activité de transfert ;

3 : présence dans la suspension cellulaire d'un faible pourcentage de cellules cassées qui libèrent dans le milieu d'incubation des enzymes solubles ou associés à des membranes intracellulaires pouvant être responsables de toute l'activité mesurée.

La réponse à ces trois objections a nécessité la mise au point d'une méthodologie fondée sur :

1 : l'utilisation d'accepteurs exogènes branchés sur des billes de Sépharose plus grosses que les cellules elles-mêmes. Ainsi, est éliminée la première cause d'erreur ;

2 : le blocage de l'entrée de sucre libre radioactif dans la cellule par la présence de phloridzine et d'un excès du monosaccharide non radioactif d'une part, et par l'inhibition de (s) ectopyrophosphatase (s) et ectophosphatase (s) dégradant les glycosyl-nucléotides par les nucleosides 5'-monophosphates d'autre part. Ces précautions éliminent la seconde cause d'erreur ;

3 : la détermination de l'incorporation d'une suspension de cellules entières (dont le pourcentage de cellules cassées est mesuré par la méthode du Bleu Trypan) et de mélanges contenant des proportions connues de cellules entières et de cellules cassées. L'extrapolation de ces valeurs à 0 % de cellules cassées permet de connaître l'activité ectoenzymatique en répondant à la troisième objection.

Cette méthodologie appliquée aux lymphocytes spléniques de Rat a donné les résultats qui peuvent être résumés de la manière suivante :

1 - L'ectogalactosyltransférase est capable de transférer des résidus de galactose à partir de l'UDP-Gal sur des accepteurs exogènes

insolubilisés, dans un processus de transglycosylation ce qui suggère une position externe de l'enzyme à la surface de la cellule. Cet enzyme est également capable de transférer 3 x 10^4 résidus galactosyl par cellule sur les accepteurs membranaires en position suffisamment externe pour qu'ils soient reconnus par une lectine spécifique. Ce fait est bien démontré par l'agglutination des lymphocytes "galactosylés" par l'agglutinine du Soja alors que les lymphocytes normaux ne le sont pas. Cette agglutination suggère également que les résidus galactosyl sont branchés en position β sur les accepteurs membranaires.

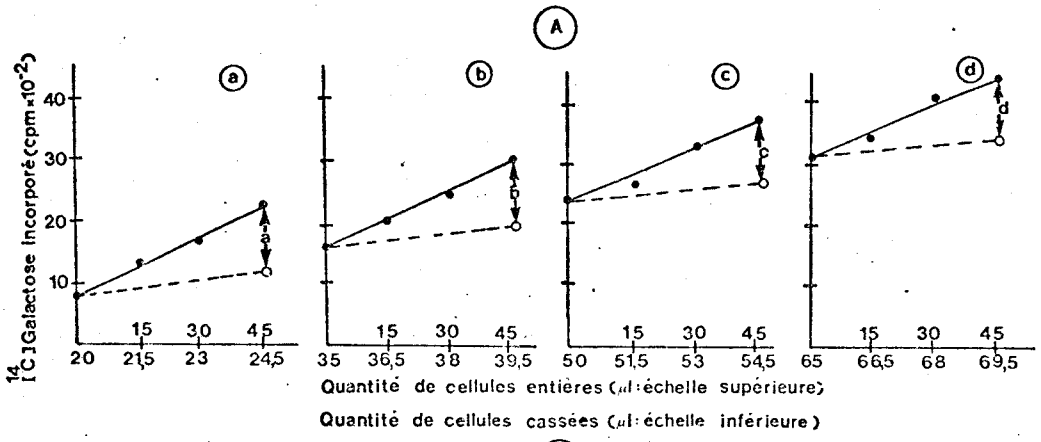
2 - L'ectosialyltransférase est capable de transférer des résidus d'acide sialique à partir de CMP-NeuNAc sur des accepteurs exogènes (glycopeptidique ou oligosaccharidique) de faible masse moléculaire alors qu'elle est incapable de le faire sur des accepteurs macromoléculaires. Cette propriété particulière de l'ectosialyltransférase permet de la distinguer des sialyltransférases intracellulaires qui sont capables de sialyler avec une même efficacité un accepteur macromoléculaire et un accepteur de faible masse moléculaire. Le fait que le transfert de résidus sialyl se produise également sur les accepteurs endogènes semble indiquer que l'enzyme est profondément enfoui dans la membrane et n'est capable de transférer des résidus d'acide sialique aux accepteurs membranaires que dans un processus de cis-glycosylation, tandis que le processus de transglycosylation n'est possible que quand la taille de l'accepteur est assez réduite pour atteindre le site actif de l'enzyme.

3 - Pour l'ectofucosyltransférase l'emploi de galactose et de di N-acétylchitobiose comme accepteurs exogènes a permis de détecter deux activités ectofucosyltransférasiques : une activité GDP-fucose : galactoside fucosyltransférasique spécifiquement inhibée par la N-éthylmaléimide et une activité GDP fucose : N-acétylglucosaminide fucosyltransférasique. Ces deux ectofucosyltransférases sont capables de brancher des résidus fucosyl sur des accepteurs de faible masse moléculaire alors qu'elles sont inéfficaces sur des accepteurs macromoléculaires. Le transfert de résidus fucosyl sur les accepteurs membranaires suggère que ces enzymes sont comme l'ectosialyltransférase profondément enfouis dans la membrane et sont capables de catalyser des réactions de cis-glycosylation tandis que le processus de transglycosylation n'est possible que quand la taille de l'accepteur est faible. De plus ces deux activités sont inhibées par de faibles concentrations en GDP.

4 - Lors de l'étude de l'ectosialyltransférase nous avons remarqué que contrairement aux observations faites avec la galactosyltransférase, les cellules entières ont une activité plus élevée que celle mesurée avec l'homogénat. Ce phénomène étant d'ailleurs retrouvé avec la fucosyltransférase. L'isolement et la caractérisation du facteur inhibiteur de l'ectosialyltransférase nous a conduit à montrer l'existence d'une cause d'erreur très importante et non encore suspectée dans la détection des ectoglycosyltransférases. Il s'agit de la libération de CMP-NeuNAc intracellulaire par les cellules cassées qui conduisant à une baisse de la radioactivité spécifique du précurseur, provoque la chute de la radioactivité liée aux accepteurs endogènes.

Si l'on revient maintenant à l'expérience de la mesure des activités glycosyltransférasiques en fonction du pourcentage de cellules cassées, il est important de noter que la radioactivité spécifique du précurseur varie à chaque point de la courbe, c'est-à-dire que l'activité glycosyltransférasique exprimée en nombre de résidus de monosaccharide radioactif incorporés (cpm) ne reflète pas la véritable activité qui doit être exprimée en picoMoles de monosaccharide incorporé. Donc chaque point de la courbe doit être corrigé en tenant compte du précurseur endogène relaché par les cellules. Comme ce facteur correctif augmente en même temps que le pourcentage de cellules cassées, les points corrigés pourraient donner naissance à une courbe qui s'extrapole à zéro. Ceci remet en question l'existence même des ectoglycosyltransférases. Nous avons donc mis au point un nouveau procédé de détection des activités ectoglycosyltransférasiques qui tient compte à la fois de cette cause d'erreur supplémentaire c'est-à-dire la libération de précurseur endogène et de la libération d'activité enzymatique intracellulaire. Cette méthode est fondée sur la mesure de l'accroissement d'activité glycosyltransférasique apportée par des cellules entières, lorsque celle-ci est mesurée en présence d'une quantité quasi-constante d'homogénat c'est-à-dire à même dilution isotopique du précurseur ; dans un deuxième temps on détermine si cet accroissement d'activité apporté par les cellules entières n'est dû qu'à la présence d'ectoaccepteurs ou si elle résulte de l'activité ectoenzymatique.

L'application de cette technique nous a permis de confirmer la présence d'une ectosialyltransférase et d'accepteurs d'acide N-acétylneuraminique sur la membrane lymphocytaire. Cette cause d'erreur n'étant pas soupçonnée lors de nos études de l'ectogalactosyl- et l'ectofucosyltransférases nous incluons maintenant l'application de cette nouvelle méthode à la détection des activités ectogalactosyltransférasique et ectofucosyltransférasique respectivement (figures 17 et 18). Dans les deux cas l'extrapolation finale



B

QUANTITE D'HOMOGENAT PRESENT DANS LE MILIEU D'INCUBATION (µL)	A: [14C] GAL INCORPORE DANS LES ACCEPTEURS ENDOGENES PAR L'HOMOGENAT SEUL (CPM)	B: VALEUR CORRIGEE POUR UNE MEME DILUTION ISOTOPIQUE (CPM)	FACTEUR DE CORRECTION B/A	AUGMENTATION DU TRANSFERT DE [14C] GAL PAR 40,5 µL DE CELLULES ENTIERES EN PRESENCE D'HOMOGENAT (CPM)	
				VALEUR TROUVEE	VALEUR CORRIGEE
24,5	1179	1179	1	1179	ID
39,5	1850	1900	1,02	1348	ID
54,5	2570	2622	1,02	1330	ID
69,5	3270	3344	1,02	1178	ID

C

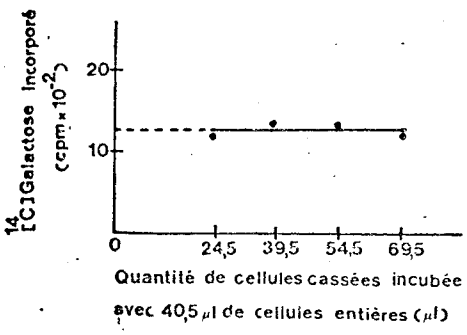


Figure 17 :

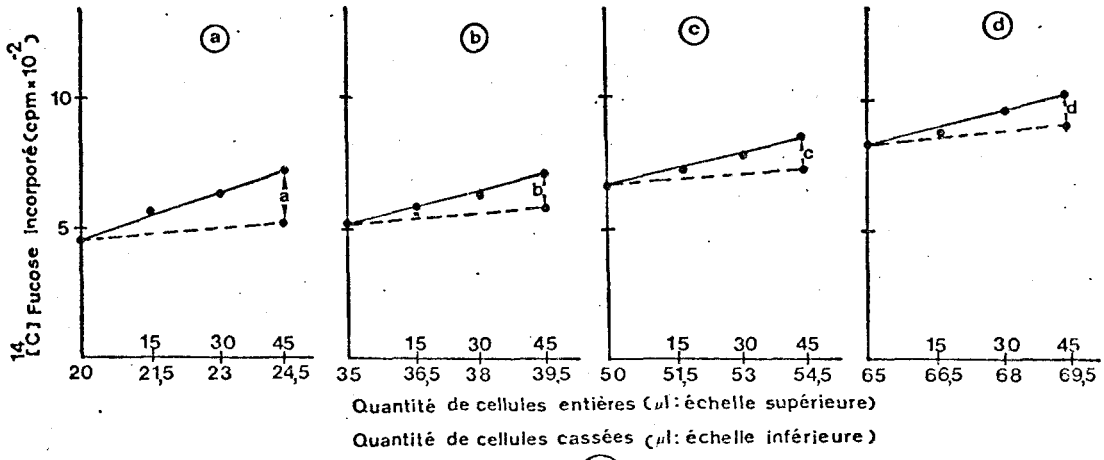
Détection de l'activité ectogalactosyltransférasique mesurée sur les accepteurs endogènes en tenant compte d'une éventuelle libération d'UDp-Gal intracellulaire.

A Incorporation de {^{14}C}Gal sur les accepteurs endogènes en utilisant un mélange de cellules cassées avec des quantités croissantes de cellules entières. En abscisse l'échelle supérieure indique le volume de la suspension cellulaire ($5 10^8$ cellules/ml) utilisée (0 à 45 µl). Ces cellules sont incubées en présence de 20 µl : a, 35 µl : b, 50 µl : c et 65 µl d d'homogénat ($5 10^8$ cellules /ml . Dans cette expérience 10 % de la suspension cellulaire se colore par le Bleu Trypan. L'échelle inférieure de l'abscisse indique la quantité totale de cellules cassées dans l'incubat de 120 µl. Les valeurs a, b, c et d indiquent la quantité de {^{14}C} Gal incorporé quand 40,5 µl de cellules entières sont incubés avec 24,5 ; 39,5 ; 54,5 ou 69,5 µl d'homogénat.

B Correction pour des dilutions isotopiques identiques du {^{14}C}Gal incorporé sur les cellules entières.

C Extrapolation finale.

A



B

QUANTITE D'HOMOGENAT PRESENT DANS LE MILIEU D'INCUBATION (µL)	A [14C]-FUCOSE INCORPORE DANS LES ACCEPTEURS ENDOGENES PAR L'HOMOGENAT SEUL (CPM)	B: VALEURS CORRIGEES POUR UNE MEME DILUTION ISOTOPIQUE (CPM)	FACTEUR DE CORRECTION B/A	AUGMENTATION DU TRANSFERT DE [14C] FUC PAR 40,5µL DE CELLULES ENTIERES EN PRESENCE D'HOMOGENAT (CPM)	
				VALEUR TROUVEE	VALEUR CORRIGEE
24,5	517	517	1	203	203
39,5	592	833	1,4	161	225
54,5	735	1150	1,56	145	226
69,5	915	1466	1,61	155	249

C

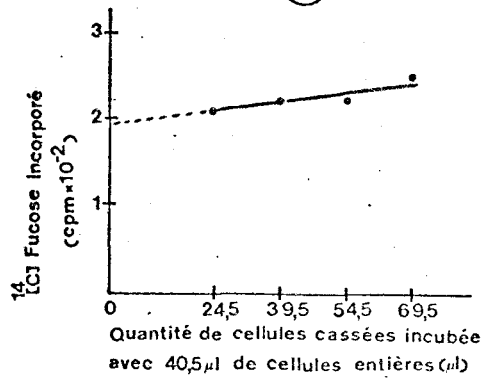


Figure 18 :

Détection de l'activité ectofucosyltransférasique mesurée sur les accepteurs endogènes en tenant compte de la libération de GDP-fucose intracellulaire.

A Incorporation de {^{14}C} Fuc sur les accepteurs endogènes en utilisant un mélange de cellules cassées avec des quantités croissantes de cellules entières. En abscisse l'échelle supérieure indique le volume de la suspension cellulaire ($3 10^8$ cellules/ml) utilisée (0 à 45 µl). Ces cellules sont incubées en présence de 20 µl : a, 35 µl : b, 50 µl : c et 65 µl d d'homogénat ($3 10^8$ cellules/ml). Dans cette expérience 10 % de la suspension cellulaire se colore au Bleu Trypan. L'échelle inférieure de l'abscisse indique la quantité totale de cellules cassées dans l'incubation de 120 µl. Les valeurs a, b, c, d indiquent la quantité de {^{14}C} Fuc incorporé quand 40,5 µl de cellules entières sont incubées avec 24,5 ; 39,5 ; 34,5 ou 69,5 µl d'homogénat.

B Correction pour des dilutions isotopiques identiques du {^{14}C} Fuc incorporé dans les cellules entières.

C Extrapolation finale.

BUS LILLE

nous confirme la présence d'ectoenzymes et d'accepteurs membranaires. Il faut cependant remarquer que contrairement à la sialyl- et à la fucosyltransférase, les facteurs de correction isotopique pour la galactosyltransférase ont une valeur constante (proche de 1) ce qui signifie que dans ce cas, la libération d'UDPGal par les cellules cassées est négligeable par rapport à la concentration en précurseur utilisée pour la mesure.

Dans la figure 19, nous avons tenté de résumer et d'expliquer le comportement des activités sialyl- et fucosyltransférasiques sur les accepteurs endogènes (figure 19A), sur les accepteurs exogènes macromoléculaires (figure 19B et sur les accepteurs exogènes de faible masse moléculaire (figure 19C) en fonction du pourcentage de cellules cassées présent dans le milieu d'incubation. L'étude de ce comportement suggère que pour chacun des deux enzymes la localisation de l'activité se fait dans deux compartiments cellulaires séparés, c'est-à-dire que l'enzyme d'un compartiment est incapable de glycosyler les accepteurs de l'autre compartiment. Ces compartiments qui sont d'une part la membrane plasmique et d'autre part les membranes intracellulaires peuvent être distingués par les caractéristiques enzymatiques suivantes :

1 : la sensibilité à la dilution isotopique lorsque l'on homogénéise les cellules ;

2 : la capacité de glycosyler les accepteurs macromoléculaires et ceux de faible masse moléculaire ;

3 : la richesse en accepteurs endogènes.

Les activités glycosyltransférasiques du compartiment correspondant à la membrane plasmique sont d'une part très sensibles à la dilution isotopique et l'environnement de l'enzyme ne lui permet que le transfert sur des accepteurs exogènes de faible masse moléculaire à l'exclusion des accepteurs exogènes macromoléculaires, d'autre part ces membranes sont riches en accepteurs endogènes.

Le second compartiment qui correspond aux membranes intracellulaires est pauvre en accepteurs endogènes, les activités enzymatiques sont peu sensibles à la dilution isotopique (les concentrations locales en CMP-NeuNAc et GDP-Fuc reste constante) et l'environnement des enzymes leur permet le transfert sur les accepteurs exogènes macromoléculaires aussi bien que sur ceux de faible masse moléculaire.

Pour l'ectogalactosyltransférase l'extrapolation finale de la figure 17 montre que la radioactivité incorporée par les cellules entières

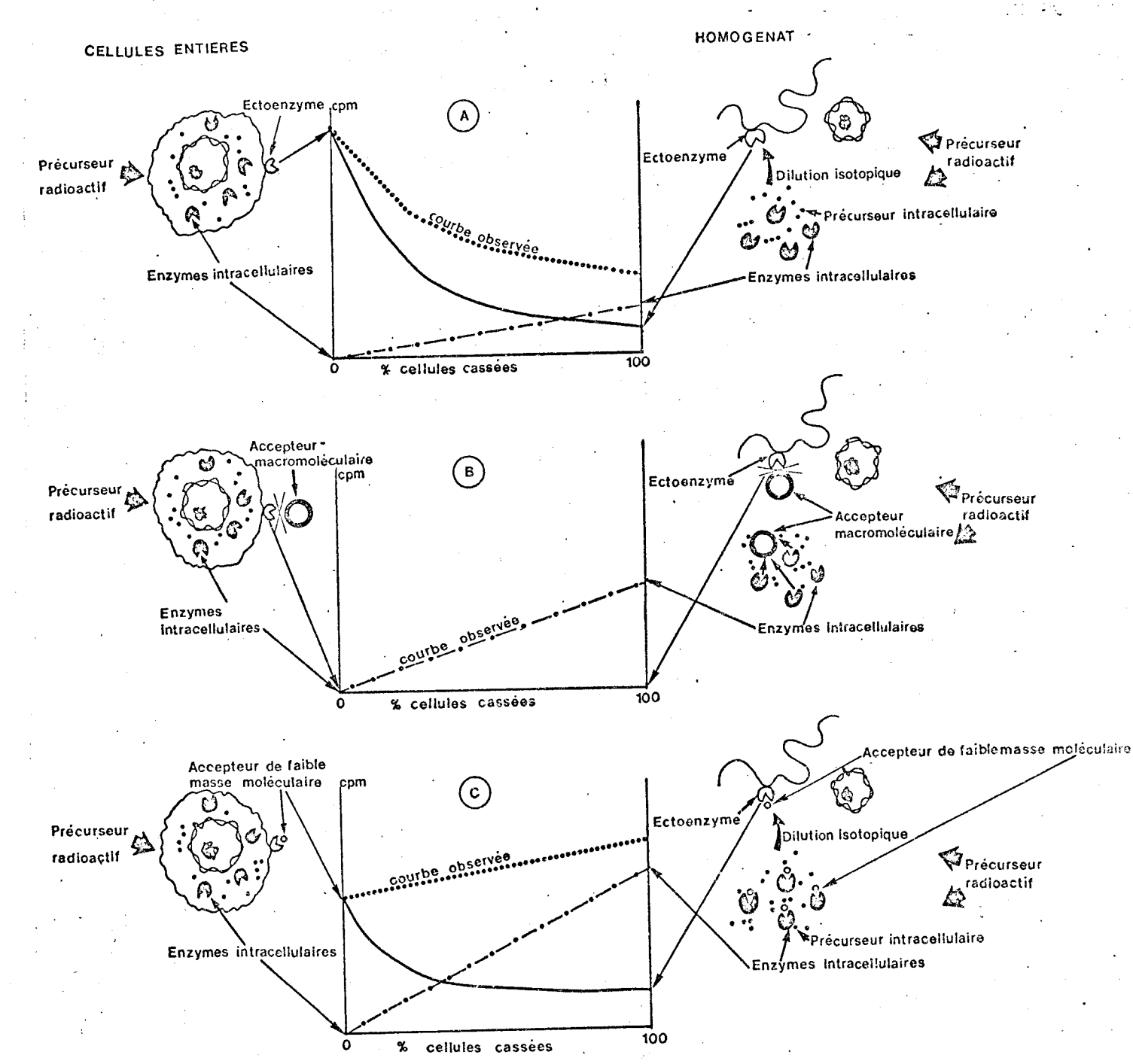


Figure 19 :

Schéma récapitulatif du comportement des activités sialyl et fucosyltransférasiques en fonction du pourcentage de cellules cassées sur les accepteurs endogènes (A), sur les accepteurs exogènes macromoléculaires (B) et sur les accepteurs exogènes de faible masse moléculaire (C). Les deux compartiments sont d'une part la membrane plasmique qui agit par ses ectoenzymes (-) et d'autre part les membranes intracellulaires qui agissent par leur glycosyltransférases (-•-). La somme des deux activités donne la courbe observée (••••).

BUS LILLE

est indépendante de la quantité d'homogénat en présence de laquelle l'incubation est réalisée. Ceci suggère également pour cet enzyme deux compartiments séparés : celui qui correspond à la membrane plasmique et celui qui correspond aux cytomembranes.

Il apparaît donc que pour les trois enzymes étudiés on observe une localisation de leur activité dans deux compartiments cellulaires, deux rôles différents peuvent donc leur être attribués : le compartiment intracellulaire serait responsable de la biosynthèse du glycanne, et la membrane plasmique serait responsable grâce à ses ectoglycosyltransférases de la réparation de ces structures après leur intégration dans la membrane de manière à ce que le "dialogue" de la cellule avec son environnement ne soit pas interrompu par la disparition des sucres terminaux des glycoconjugués membranaires. En outre la galactosyltransférase s'est révélée le seul enzyme capable de transglycosylation. A cet égard il faut noter que c'est souvent cet enzyme qui est impliqué plus ou moins clairement dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire.

APPENDICE TECHNIQUE

Nous décrirons ici les techniques que nous avons mises au point et qui ne sont pas détaillées dans les différents articles.

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE : LES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT

A - PREPARATION

Les lymphocytes spléniques ont été préparés à partir de Rats Wistar âgés de 6 semaines suivant la méthode de LAMONT *et al.* (416). Toutes les opérations s'effectuent à 4° C. La rate est dilacérée dans un tampon de pH 7,4 (cacodylate de sodium 0,1 M, Nacl 0,154 M). Après filtration sur gaze la suspension est centrifugée à 500 g pendant 7 min. Le culot est débarrassé des hématies par une hémolyse de 3 min. dans la solution suivante ajustée à pH 7,4 : NH_4cl 0,154 M, EDTA 0,1M, $KHCO_3$ 0,01 M en présence de 10 % de sérum de veau foetal (NOVOGRODSKY : communication personnelle). Après une nouvelle filtration sur gaze, la suspension est centrifugée à 500 g pendant 7 min. et le culot est relavé avec le tampon cacodylate de sodium ci-dessus. Les lymphocytes sont ensuite remis en suspension à la concentration utilisée dans ce même tampon.

B - COMPTAGE ET MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

Les lymphocytes sont comptés après dilution au 1/100ème de la solution-stock grâce à une cellule à numération de Malassez. Pour la mesure de la viabilité, le comptage est effectué en présence d'une solution de Bleu Trypan (0,5 g % ml d'une solution de NaCl 0,85 %) diluée au 1/20ème dans la suspension cellulaire. Le pourcentage de cellules colorées indique le pourcentage de cellules non viables. Cette mesure est effectuée avant et après l'incubation. Les suspensions contenant plus de 15 % de cellules colorées ne sont pas utilisées pour les expériences d'incorporation.

C - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE *

De manière à vérifier l'homogénéité de la préparation cellulaire des contrôles ont été effectués en microscopie électronique à différentes étapes de la préparation.

Les culots de lymphocytes sont alors fixés pendant une heure

* Nous remercions Bernard LASSALLE du service du Pr BOILLY d'avoir bien voulu effectuer pour nous les contrôles en microscopie électronique.

par la glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,06 M pH 7,4. Après lavage dans le tampon précédent, les pièces sont post-fixées pendant 1,5 h à 4° C par le tétroxyde d'osmium (solution à 1 % dans le même tampon). Après lavage dans le tampon cacodylate 0,1 M, NaCl 0,154 M pH 7,4, les culots sont imprégnés dans des solutions aqueuses d'acétone : 50 % (V/V) 2 fois 5 min. ; 70 % (V/V) 2 fois 8 min. ; 90 % (V/V) 2 fois 15 min. ; puis acétone pur 2 fois 30 min. Après imprégnation pendant 1,5 h dans une solution d'araldite dans l'acétone, les culots sont inclus dans l'araldite pure, coupés, et contrastés par l'acétate d'uranyl en solution alcoolique et par les sels de plomb.

La figure 20 montre les images obtenues dans ces conditions. Avant l'étape d'hémolyse, la population est très hétérogène, on distingue outre des globules rouges, des plaquettes, des macrophages et des leucocytes (Fig. 20 a). Après hémolyse 95 % de la population cellulaire est constituée de lymphocytes (Fig. 20 b). La morphologie est bien conservée (Fig. 20 c) en particulier la membrane cellulaire n'est pas lésée (Fig. 20 d).

II - PREPARATION DE LA GLYCOPHORINE ET DE SES GLYCOPEPTIDES *

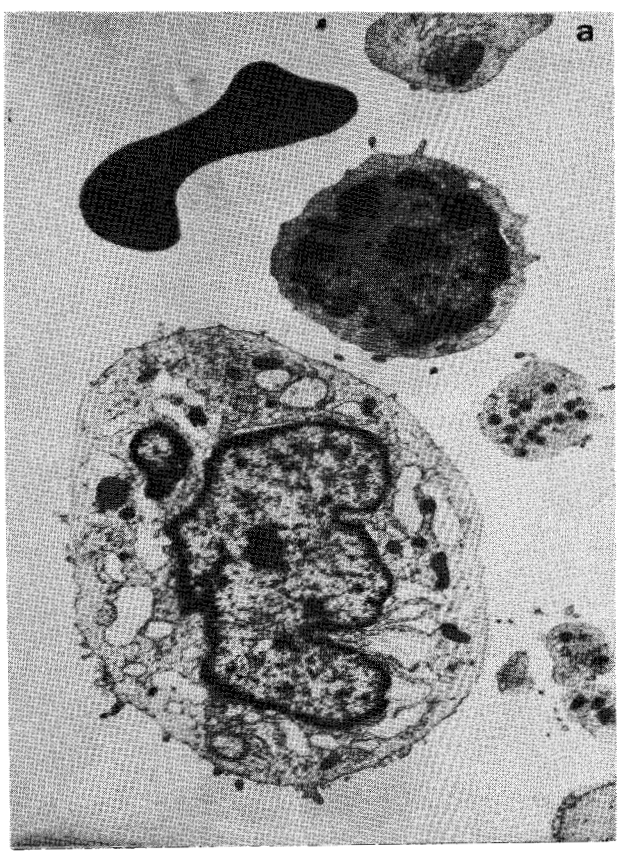
A - PREPARATION ET CONTROLE DE LA PURETE

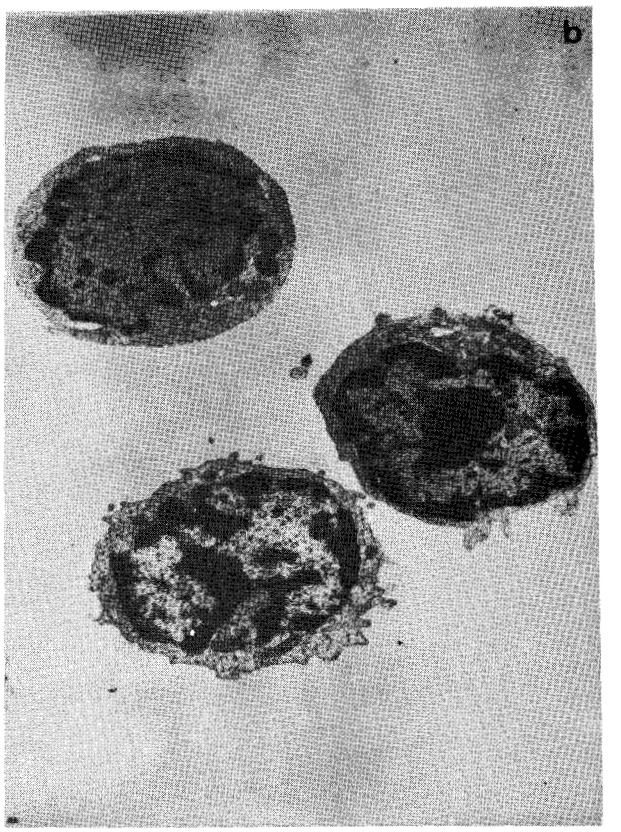
La glycophorine a été extraite d'hématies humaines ORh^+ en deux étapes. Après la préparation des membranes réalisée par la méthode de DODGE *et al.* (417), les membranes sont dissoutes dans une solution de diiodosalicylate de lithium (LIS) et la glycophorine est extraite par le mélange phénol-eau suivant la méthode de MARCHESI et ANDREWS (418). La purification s'effectue sur colonne de phosphocellulose P 11 (Whatman).

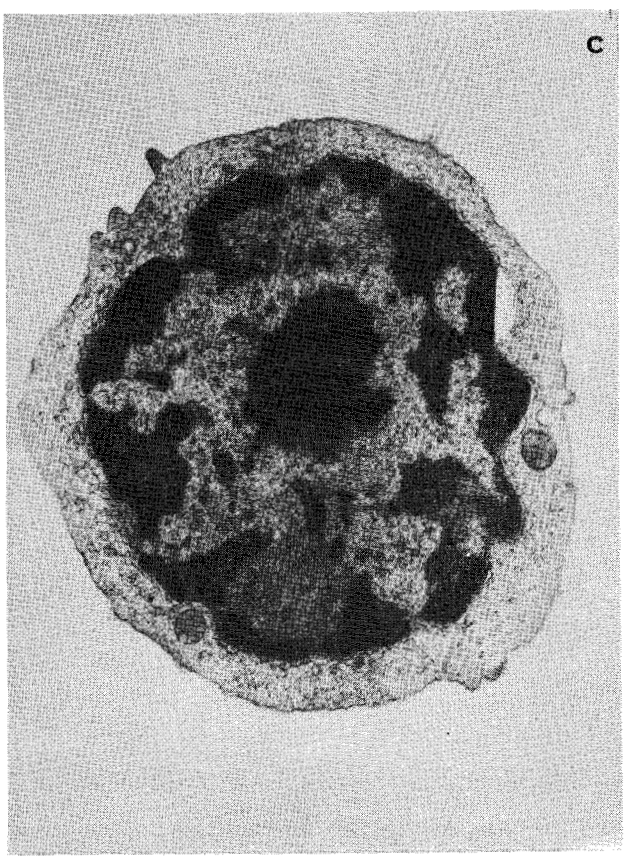
La pureté de la préparation qui contient 14,7 % de sucres neutres et 24,3 % d'acide sialique a été contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS) selon la méthode de NEVILLE (419). La révélation à l'aide de la technique du PAS par la méthode de FAIRBANKS *et al.* (420) (voir figure 21) laisse apparaître 2 bandes principales PAS-1 et PAS-2 correspondant à la glycophorine (dimère et monomère) d'après MARTON et GARVIN (421) et 2 bandes mineures PAS-3 et PAS-4 correspondant d'après

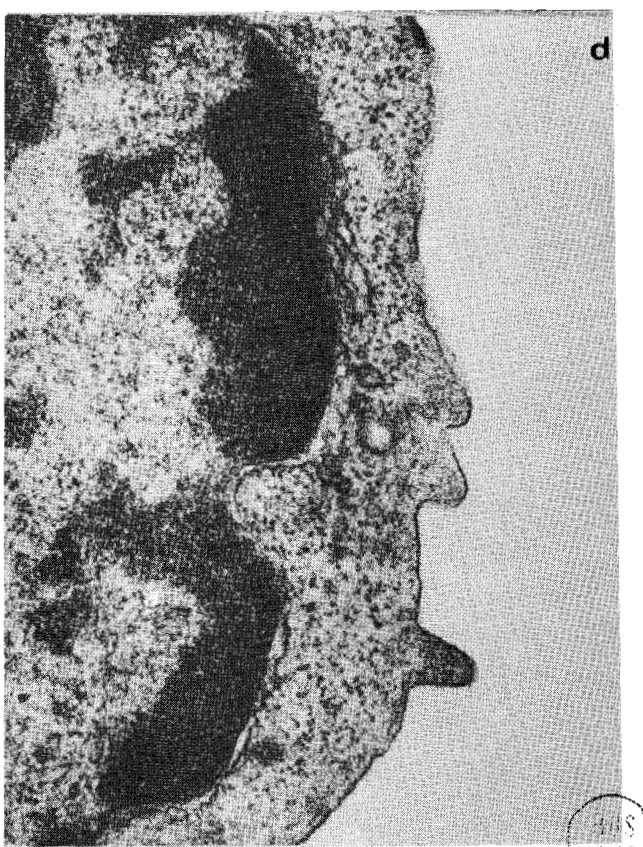
* Ce chapitre a été réalisé en collaboration avec Philippe DEBEIRE et les résultats ont fait l'objet de son D.E.A. soutenu en octobre 1975.

Nous remercions Monsieur le Professeur GOUDEMAND Directeur du C.R.T.S. de Lille pour les hématies qu'il nous a aimablement fournies.









ULLE

Figure 20 :

Observation au microscope électronique de la préparation de lymphocytes : a) avant hémolyse (x 5000), b) après hémolyse (x 6000), c) lymphocyte (x 12000), d) aspect de la membrane lymphocytaire (x 32000).

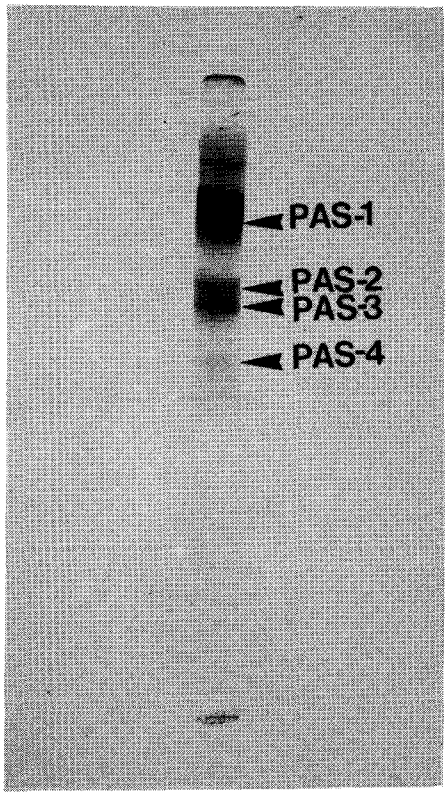


Figure 21 :

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de la glycophorine. Le dépôt est de 50 μg et la révélation est effectuée par la méthode à l'acide periodique-Schiff (PAS).

FURTHMAYR *et al.* (422) à des glycoprotéines mineures de même composition glucidique que la glycophorine. Le Tableau VII montre que notre préparation est peu différente de celle obtenue par d'autres auteurs en particulier pour sa richesse en acide sialique. Cette propriété ainsi que l'origine membranaire de cette glycoprotéine, en fait un accepteur de choix pour étudier les sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse de glycoprotéines membranaires.

B - PREPARATION DE L'ASIALOGLYCOPHORINE

La désialylation s'effectue comme dans le cas des autres glycoprotéines par hydrolyse acide ménagée par H_2SO_4 0,01 N, 100 ° C durant 30 min. Dans ces conditions la désialylation complète est vérifiée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse.

TABLEAU VII

RAPPORT CENTESIMAL ET MOLAIRE DE LA COMPOSITION EN GLUCIDES DE LA GLYCOPHORINE. COMPARAISON DE NOTRE PREPARATION AVEC CELLE D'AUTRES AUTEURS

	Notre préparation		D'après WINZLER (423)	D'après FUKUDA et OSAWA (424)	D'après FURTHMAYR *et al.* (425)
	Rapport Molaire pour 3 Man	Composition en glucides exprimée en g pour 100			
Gal	18	9,5	13,2	9,91	10,7
Man	3	1,6	2,6	2,85	2,9
Fuc	2	0,96	1,2	1,3	1
Glc	2	1,05	0,3	-	0,6
GlcNAc	9	5,9	6,5	5,45	6,7
GalNAc	15	9,7	13,5	10,33	10,8
NeuNAc	30	27,2	27,8	23,6	20,7

BUS LILLE

C - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

La glycophorine désialylée est soumise à une hydrolyse pronasique dans une solution d'acétate de calcium 0,01 M selon le procédé de YAMASHINA et MAKINO (426). Pour 100 mg de glycophorine désialylée, on ajoute 2 mg de pronase dans 10 ml de la solution d'acétate de calcium. L'hydrolyse s'effectue durant 48 heures et le pH est maintenu à 8 par addition de NaOH 0,1 N. La figure 22 montre une chromatographie sur Biogel P_6 de l'hydrolysat

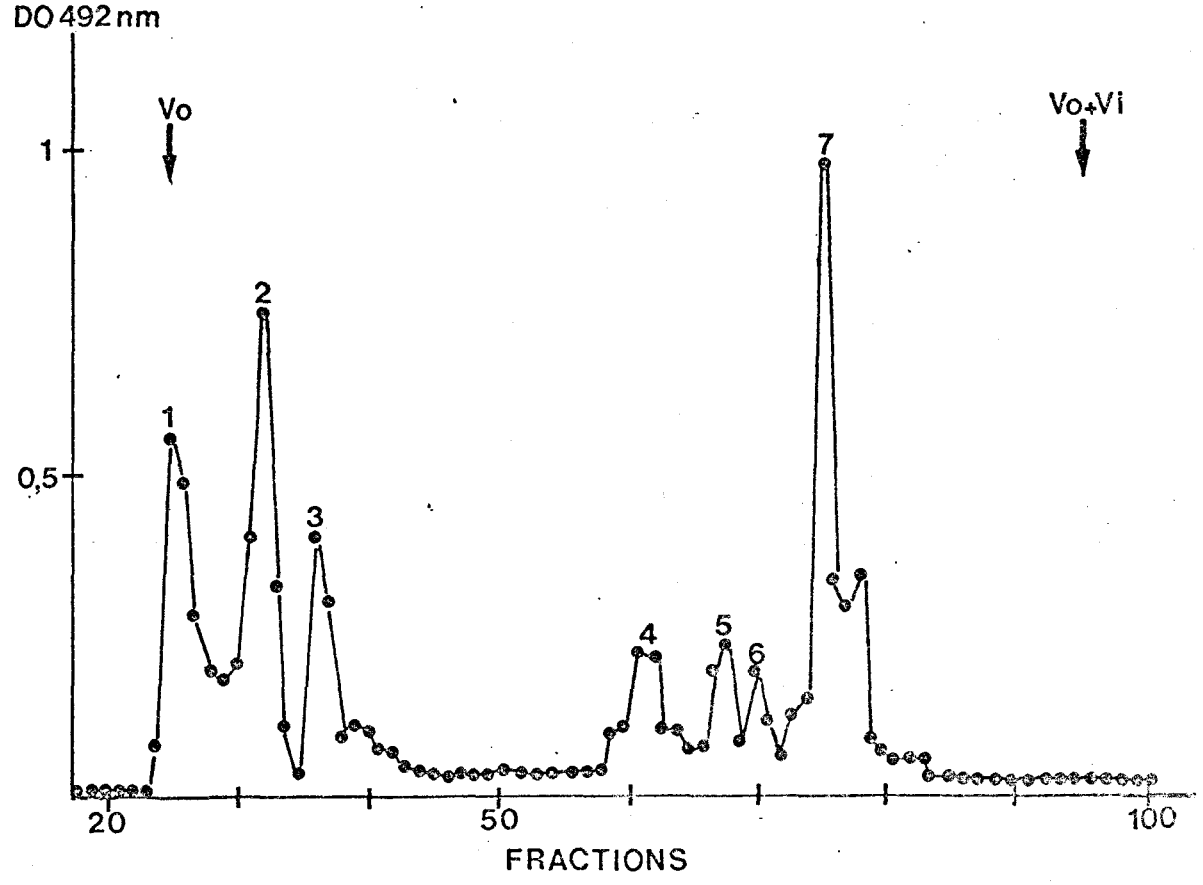


Figure 22 :

Chromatographie sur Biogel P_6 de l'hydrolysat pronasique de la glycophorine désialylée (colonne de 2 x 50 cm, débit de 10 ml/h, fractions de 1,5 ml). La présence de glucides dans chaque fraction est repérée par la méthode au phénol sulfurique.

pronasique. Après repérage des fractions par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS *et al.*: 427) 7 pics sont visibles. Le pic n° 7 contient un glycopeptide dont la masse moléculaire est d'environ 1000 daltons et contient un résidu de galactose pour un résidu de N-acétylgalactosamine. La présence de sérine parmi les aminoacides suggère qu'il peut s'agir du glycopeptide dont la structure a été démontrée par ADAMANY et KATHAN (428):

$$\text{Gal} \xrightarrow{\beta\text{-}1,3} \text{GalNAc} \longrightarrow \text{Ser}$$

Ce glycopeptide est utilisé comme accepteur de faible masse moléculaire de l'acide N-acétylneuraminique.

III - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS EXOGENES INSOLUBILISES

Quand des accepteurs exogènes insolubilisés sont utilisés, la séparation entre cellules et accepteurs est réalisée en milieu métrizamide (Nyegaard and Co) (Fig. 23).

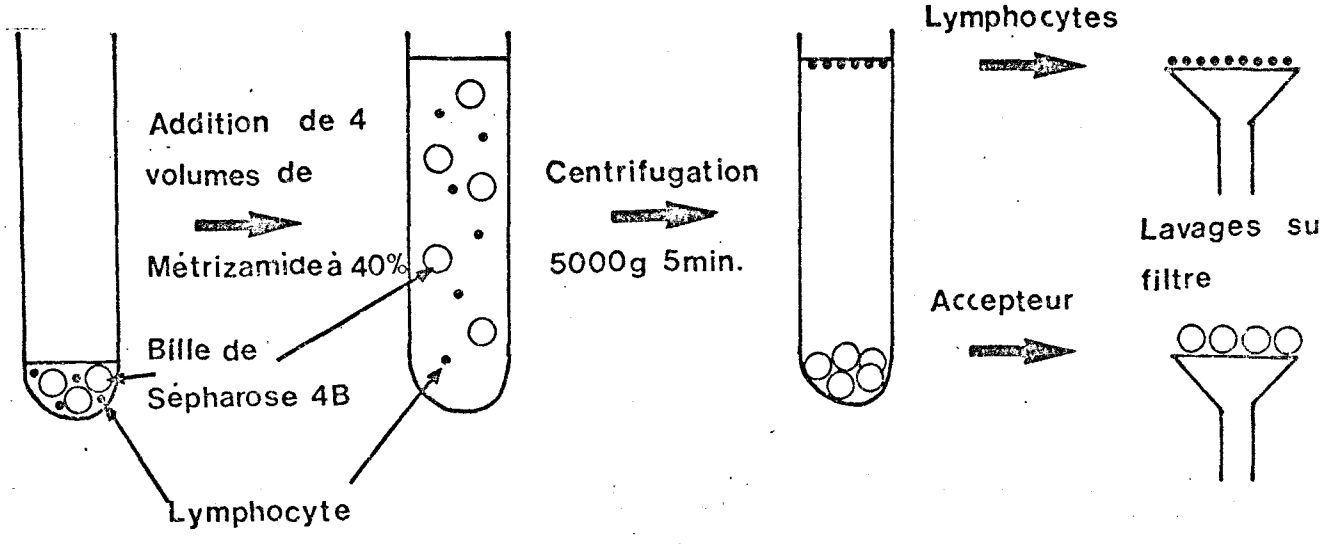


Figure 23 :
Principe de la séparation des cellules et des accepteurs exogènes insolubilisés en utilisant la centrifugation en milieu Métrizamide.

L'arrêt de la réaction est réalisé en ajoutant 4 volumes de métrizamide à 40 %. Le milieu possède alors une concentration finale de 32 % en métrizamide. Cette solution isotonique a une densité de 1,17 qui est supérieure à celle des cellules. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 min., les cellules dont la viabilité est vérifiée par l'exclusion du Bleu Trypan sont rassemblées en surface et les billes de Sépharose forment un culot. Les

cellules sont récupérées grâce à une pipette Pasteur, lavées par centrifugation avec du Nacl 0,154 M puis précipitées et collectées sur filtre en fibre de verre (Whatman GF 83). Les billes de Sépharose sont lavées avec du Nacl 1,54 M pour éviter l'adsorption du précurseur, transférées sur des filtres en fibre de verre (Whatman GF 83), lavées abondamment avec du Nacl 1,54 M puis avec de l'éthanol absolu. Le comptage s'effectue par scintillation liquide.

IV - PREPARATION ET MARQUAGE DE LA LECTINE DU SOJA (SBA)*

A - ARTICLE VII : Marquage de l'agglutinine du Soja par oxydation au periodate de sodium suivie par une réduction grâce au [^{3}H] borohydrure de sodium

La démonstration de la position externe des résidus galactosyl incorporés par l'ectogalactosyltransférase nécessite l'emploi d'une sonde qui doit avoir les propriétés suivantes :

- se lier fortement et spécifiquement aux résidus galactosyl en position terminale non réductrice ;
- ne pas entrer dans la cellule, c'est-à-dire ne se fixer qu'aux résidus galactosyl de la membrane plasmique ;
- pouvoir déceler une différence très faible du taux de résidus galactosyl membranaires (au moins 30 000) (Nathan SHARON : communication personnelle).

La lectine du Soja (SBA) répond à ces trois conditions (voir LIS et SHARON : 429). Le repérage de la lectine peut alors se faire de deux manières : soit par différence entre l'agglutinabilité des cellules témoins et des cellules incubées avec de l'UDP-Gal soit par mesure de la différence dans la fixation d'une SBA fortement radioactive sur des lymphocytes témoins et des lymphocytes incubés avec de l'UDP-Gal. L'article VII décrit la méthode de marquage utilisée pour obtenir une telle lectine.

La SBA est une glycoprotéine de masse moléculaire de 120 000 daltons (LOTAN *et al.* : 430) elle est formée de 4 sous-unités possédant chacune un glycanne contenant 9 résidus de mannose et 2 résidus de N-acétylglucosamide (SHARON *et al.* : 431). Comme cette molécule est totalement dépourvue de ponts disulfures et de groupements SH pouvant être affectés par l'oxydation et la réduction, la méthode la plus simple de marquage consiste en une oxydation periodique suivie par une réduction des fonctions aldéhydiques formées par le borohydrure de sodium tritié B $[^3H]_4$ Na.

* Cette partie du travail a été réalisée au Département de Biophysique du WeizmannInstitute of Science (Rehovot) Israël, sous la direction du Professeur Nathan SHARON en collaboration avec Reuben LOTAN et Henri DEBRAY.

Communication

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 250, No. 5, Issue of March 10, pp. 1955-1957, 1975
Printed in U.S.A.

Labeling of Soybean Agglutinin by Oxidation with Sodium Periodate Followed by Reduction with Sodium [^{3}H]Borohydride*

(Received for publication, December 2, 1974)

REUBEN LOTAN, HENRI DEBRAY,‡ MONIQUE CACAN,‡
RENÉ CACAN,‡ AND NATHAN SHARON§
From the Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

SUMMARY

Periodate oxidation of soybean agglutinin, a glycoprotein lectin, resulted in destruction of up to 5 out of the 9 mannose residues present in each of its subunits (MW 30,000) without any loss of hemagglutinating activity. The oxidation did, however, abolish the interaction of soybean agglutinin with concanavalin A, as measured by quantitative precipitation. Reduction with sodium [^{3}H]borohydride of soybean agglutinin in which 4 out of 9 mannose residues per subunit were oxidized, afforded a radioactive product which retained full hemagglutinating activity and was indistinguishable from the native lectin by gel filtration, gel electrophoresis, and affinity chromatography. These results establish that the integrity of the carbohydrate side chain of soybean agglutinin is not essential for the biological activity of the lectin, and suggest a general method for the preparation of radioactive glycoprotein lectins.

Radioactively labeled lectins are being used to an increasing extent for the study of the molecular architecture of surfaces of both normal and malignant cells (1, 2). The labeling procedures used thus far have usually been based on chemical modification of amino acid side chains, *e.g.* by iodination with ^{125}I or acetylation with [^{14}C]- or [^{3}H]acetic anhydride.

Soybean agglutinin is a glycoprotein lectin, comprised of 4 apparently identical subunits of molecular weight 30,000 (3), each of which carries a carbohydrate side chain consisting of 9 mannose and 2 *N*-acetyl-D-glucosamine residues (4). Studies on a glycopeptide isolated from a pronase digest of soybean agglutinin have shown that about half of the mannose and of the *N*-acetyl-D-glucosamine residues are susceptible to periodate oxidation (5). Moreover, soybean agglutinin is devoid of S—S and —SH groups which might be affected by oxidizing and reducing reagents. Soybean agglutinin seemed eminently suitable, therefore, for labeling by periodate oxidation followed by reduction with sodium [^{3}H]borohydride, provided that the integrity of the carbohydrate side chain is not essential for the biological activity of the lectin. As shown in the present communication, soybean agglutinin modified by the above sequence of reactions affords a radioactive derivative that retains its full biological activity.

Although periodate oxidation followed by sodium [^{3}H]borohydride reduction has been used in the past for the labeling of glycoproteins containing sialic acid (6), to our knowledge this is the first demonstration of the use of the same technique for the labeling of glycoproteins, such as plant lectins, which are devoid of sialic acid (7, 8).

For periodate oxidation studies, soybean agglutinin purified by affinity chromatography (9) (20 mg) was dissolved in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 4.5 (1.3 ml). Sodium metaperiodate (0.01 M, 1.3 ml) was then added and the solution was stirred in the dark at 0°. At various time intervals, 50-μl aliquots were withdrawn, diluted to 6 ml with water, and the absorbance at 222 nm was measured to determine periodate consumption (10). In parallel, 250-μl aliquots of the oxidation mixture were added to 100 μl of ethylene glycol to destroy excess periodate, and then dialyzed against 0.9% NaCl. The latter samples were used for the determination of unoxidized, residual mannose by the phenol-sulfuric acid procedure (11) and for the photometric determination of hemagglutinating activity with trypsin-treated rabbit erythrocytes (12). Fig. 1*A* shows that the rate of oxidation of soybean agglutinin by periodate is fairly constant up to 1 hour, at which time 4 mannose residues are oxidized per subunit (MW 30,000) with concomitant consumption of 9 mol of periodate. The rate then decreases so that after 4 hours only 1 additional mannose residue is oxidized. The remaining 4 mannose residues seem to be resistant to periodate oxidation, since even after 24 hours no further change in their number occurred. This has also been previously observed in periodate oxidation studies of the isolated soybean agglutinin glycopeptide (5). The hemagglutinating activity is not impaired even after 24 hours of oxidation (Fig. 1*B*). As expected, however, the oxidation of the mannose residues decreased the interaction of soybean agglutinin with concanavalin A, as measured by the quantitative precipitation reaction (13). After destruction of 5 mol of mannose per subunit, concanavalin A no longer precipitated soybean agglutinin (Fig. 2). This finding suggests that oxidized soybean agglutinin can be used in studies of the competition between concanavalin A and soybean agglutinin for binding on cell surfaces (2). Such experiments, which provide information on the relative disposition of lectins on cells, could not be carried out previously because of the interaction between concanavalin A and soybean agglutinin (13).

For the preparation of the tritium-labeled lectin, soybean agglutinin (20 mg in 2.6 ml of 0.1 M sodium acetate, pH 4.5, containing 0.005 M sodium metaperiodate) was oxidized for 1 hour under the conditions described above. The reaction was stopped by the addition of 1 ml of ethylene glycol, followed by incubation for 30 min at 0°. After extensive dialysis against 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, the solution was concentrated to 1 ml by ultrafiltration and added to an ampoule containing 2.6 mg of sodium [^{3}H]borohydride (177.8 mCi/mmol). Reduction proceeded overnight at 0° in the dark and excess borohydride was decomposed by lowering the pH to 5.0 with

* This study was supported by Grant 379 from the United States-Israel Binational Science Foundation, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

‡ Permanent address, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille 1, B.P. 36, 59 Villeneuve d'Ascq, France.

§ Established Investigator of the Chief Scientist's Bureau, Ministry of Health, Israel.

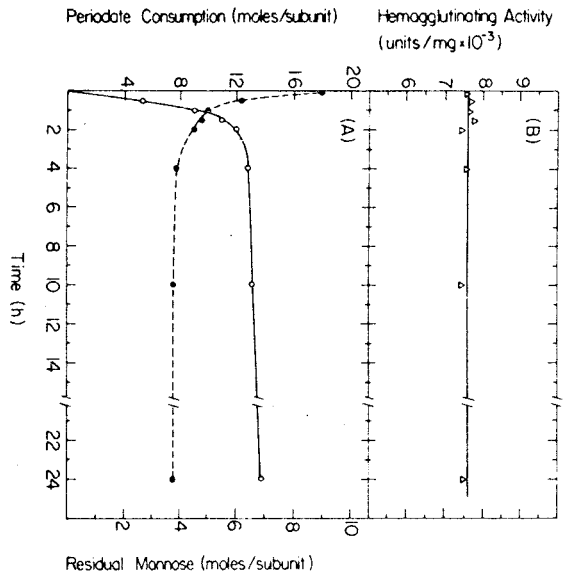


FIG. 1. Oxidation of soybean agglutinin by periodate. *A*, periodate consumption and mannose destruction during oxidation: ○——○, moles of periodate consumed per subunit; ●- - -●, residual mannose (moles per subunit). *B*, effect of oxidation on the hemagglutinating activity of soybean agglutinin; △——△, hemagglutinating units per mg (12).

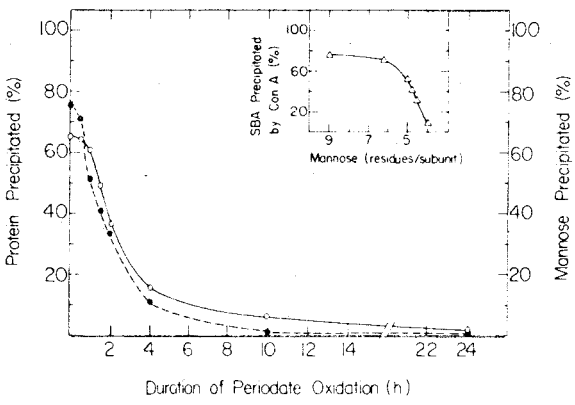


FIG. 2. Precipitation of oxidized soybean agglutinin (*SBA*) by concanavalin A (*Con A*) (13). Soybean agglutinin (330 μg), native or oxidized for various periods of time, was mixed with concanavalin A (90 μg) in a final volume of 360 μl of 0.25 M NaCl-0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, in Eppendorf microtubes. After 24 hours at room temperature the tubes were centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min. The supernatant was used for spectrophotometric determination of protein using $A_{280}^{1\%} = 13$ for both soybean agglutinin (3) and concanavalin A (14) and the precipitate (after washing with 0.25 M NaCl) was used for the determination of mannose by the phenol-sulfuric acid procedure (11). ○——○, protein precipitated expressed as percentage of total protein; ●- - -●, mannose in precipitate expressed as percentage of total unoxidized mannose. *Inset*, relation between the number of mannose residues in soybean agglutinin and its precipitation by concanavalin A: △——△, soybean agglutinin precipitated by concanavalin A expressed as percentage of total soybean agglutinin in reaction mixture.

acetic acid. The solution was fractionated on a column (1.9 × 45 cm) of Sephadex G-150 superfine (Fig. 3*A*).

Two radioactive protein peaks, both labeled to the same extent, emerged (counting was in Bray's scintillation liquid using a Packard Tri-Carb scintillation spectrometer with an efficiency of 58%). The first peak, a minor one, was eluted at a volume corresponding to that of high molecular weight aggregates of soybean agglutinin (15). Indeed, the hemagglutinating activity of the material in the first peak was higher than that of native soybean agglutinin (Fig. 3*B*), as had been earlier observed by us with the soybean agglutinin polymers obtained by cross-linking

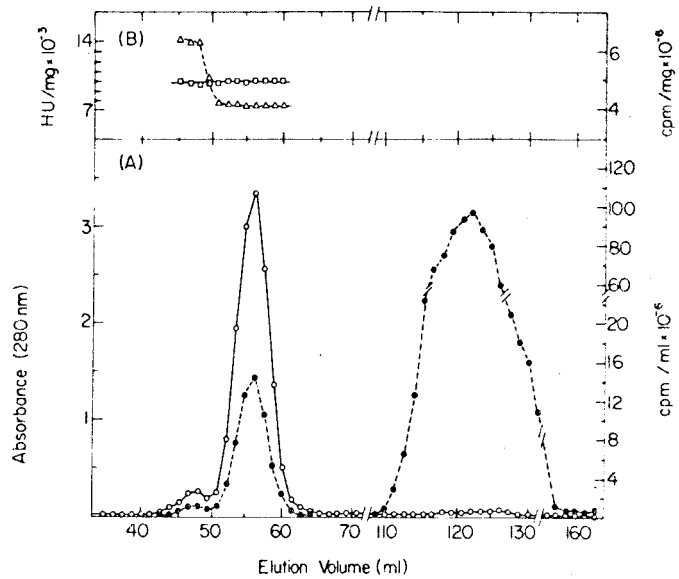


FIG. 3. Gel filtration of tritiated soybean agglutinin. Soybean agglutinin, subsequent to periodate oxidation and sodium [³H]borohydride reduction (20 mg), was applied to a column (1.9 × 45 cm) of Sephadex G-150 superfine, kept at 4°. Elution was with 0.9% NaCl. Fractions of 1.3 ml were collected at a flow rate of 5 ml per hour. *A*, ○——○, absorbance at 280 nm; ●- - -●, radioactivity. *B*, △- - -△, hemagglutinating activity; □——□, specific radioactivity (cpm per mg). *HU*, hemagglutinating units.

of the native lectin with glutaraldehyde (15). In the present study, however, the aggregation is probably the result of the formation of intermolecular Schiff bases between the aldehyde groups on oxidized soybean agglutinin and free amino groups on the protein molecules. The second peak, which contained the bulk of the protein, emerged from the column with exactly the same elution volume as native soybean agglutinin. Its specific radioactivity (5 × 10⁶ cpm/mg) and hemagglutinating activity were constant throughout the peak (Fig. 3*B*), the latter being close to that found for native soybean agglutinin (7000 to 8000 hemagglutinating units/mg). The total amount of the tritiated protein present in the second peak was 16 mg (80% of the starting material).

On polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.3 (16) in 7.5% gels, [³H]soybean agglutinin (20 μg, 10⁵ cpm) migrated exactly like native soybean agglutinin, all of the radioactivity being present in the protein band. On affinity chromatography of [³H] soybean agglutinin (5 × 10⁶ cpm) on a column of Sepharose-*N*-ε-aminocaproyl-β-D-galactopyranosylamine (9) all of the radioactivity was adsorbed on the column and could only be eluted with 0.05 M D-galactose, at the same volume at which unmodified soybean agglutinin is eluted.

Analysis of an acid hydrolysate (5 × 10⁶ cpm, 6 N HCl, 22 hours at 110° in sealed evacuated tubes) on an amino acid analyzer to which a radioactive flow analyzer (Packard model 3022) was attached, did not reveal any radioactive amino acid peaks. All of the radioactivity was eluted from both the long and short amino acid analyzer columns with the void volume.

The evidence presented above indicates that the oxidation and reduction did not affect the size or charge of soybean agglutinin, nor its hemagglutinating activity, suggesting that the carbohydrate side chain is not essential for this activity. In this respect soybean agglutinin differs from the recently described mammalian hepatic lectin (17), where agglutination of red cells requires the presence of intact sialic acid residues on the lectin.

Since many lectins resemble soybean agglutinin in that they

are glycoproteins devoid of S—S and —SH groups (7), the procedure described may also be used for their labeling.

REFERENCES

1. Lis, H., and Sharon, N. (1973) *Annu. Rev. Biochem.* **42,** 541–574
2. Sharon, N., and Lis, H. (1974) *Methods Membr. Biol.* **3,** 243–296
3. Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H., and Sharon, N. (1974) *J. Biol. Chem.* **249,** 1219–1224
4. Sharon, N., Lis, H., and Lotan, R. (1974) *Colloq. Int. du Cent. Natl. Rech. Sci.*, **221,** 693–710
5. Lis, H. (1968) *Isr. J. Chem.* **6,** 114p
6. Van Lenten, L., and Ashwell, G. (1971) *J. Biol. Chem.* **246,** 1889–1894
7. Sharon, N., and Lis, H. (1972) *Science* **177,** 949–959
8. Sharon, N. (1974) in *Plant Carbohydrate Biochemistry* (Pridham, J. B., ed) pp. 235–252, Academic Press, New York
9. Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H., and Sharon, N. (1972) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **24,** 193–196
10. Guthrie, R. D. (1962) in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R. L., and Wolfrom, M. L., eds) Vol. 1, pp. 440–441, Academic Press, New York
11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28,** 350–356
12. Lis, H., and Sharon, N. (1972) *Methods Enzymol.* **28,** 360–368
13. Goldstein, I. J., So, L. L., Yang, Y., and Callies, Q. C. (1969) *J. Immunol.* **103,** 695–698
14. Cunningham, B. A., Wang, J. L., Pflumm, M. N., and Edelman, G. M. (1972) *Biochemistry* **11,** 3233–3239
15. Lotan, R., Lis, H., Rosenwasser, A., Novogrodsky, A., and Sharon, N. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55,** 1347–1355
16. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., and Williams, D. E. (1962) *Nature* **195,** 281–283
17. Stockert, R. J., Morell, A. G., and Scheinberg, I. H. (1974) *Science* **186,** 365–366

B - ARTICLE VIII : Présence de deux types de sous-unités dans l'agglutinine du Soja

Pour vérifier la pureté de la SBA utilisée d'une part et pour étudier si les traitements chimiques en vue du marquage n'altéraient pas la structure de la lectine d'autre part, une analyse de la SBA a été faite par disc-électrophorèse en milieu dénaturant. Cette étude réalisée à pH alcalin et en présence de SDS a révélé que l'agglutinine du Soja est formée de deux types différents de sous-unités, et que cette lectine tétramérique est formée par l'association de deux dimères de type I_2 II_2. Quand la SBA marquée est étudiée de la même façon, 90 % de la radioactivité migre dans ces deux pics I et II ce qui montre que les sous-unités I et II sont des glycoprotéines. La vérification que la SBA utilisée contient une faible proportion de lectine dimérisée et de fragments (voir la figure 2 de l'article VIII) est nécessaire avant toute utilisation. En particulier, le calcul du nombre de sites membranaires capables de fixer la lectine, nécessite la connaissance de sa valence. Dans notre cas la SBA utilisée pour ce genre de mesure est marquée de manière identique sur ces deux sous-unités tout en conservant sa bivalence.

Volume 57, number 1 FEBS LETTERS September 1975

ON THE PRESENCE OF TWO TYPES OF SUBUNIT IN SOYBEAN AGGLUTININ

Reuben LOTAN, René CACAN*, Monique CACAN*, Henri DEBRAY*,
William G. CARTER and Nathan SHARON
Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science Rehovoth, Israel

Received 30 June 1975

1. Introduction

Soybean Agglutinin (SBA), a glycoprotein lectin (mol. wt. 120 000) is comprised of four subunits of 30 000 daltons each [1]. The lectin interacts specifically with *N*-acetyl-D-galactosamine and D-galactose [2] and possesses two saccharide binding sites per 120 000 daltons [1]. Although the number of binding sites is half the number of subunits, no differences could be previously detected between the subunits [1].

Recently it has been demonstrated that discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis at alkaline pH, in the presence of urea or sodium dodecyl sulfate (SDS), has a high resolving power in separating similar polypeptide chains. With this technique, differences have been found between the subunits of tubulin [3,4] and of the lectin from *Dolichos biflorus* [5,6], proteins that were believed to be comprised of identical subunits.

We have now reinvestigated the subunit structure of SBA using the above technique and found that the lectin is composed of two types of subunit. These were separated by ion exchange chromatography in the presence of urea and were found to differ in their charge.

2. Materials and methods

Soybean agglutinin was purified by affinity chromatography on Sepharose-*N*-ε-aminocaproyl-β-D-galactopyranosylamine [7]. The lectin was radioactively labeled by oxidation of its carbohydrate side chain with sodium periodate, followed by reduction with sodium [^{3}H] borohydride [8].

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the following systems: (a) In sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1% SDS (BDH, specially pure) [9]. (b) In a discontinuous anionic, pH 9.7 glycine system in the presence of 8 M cyanate free urea (Schwartz/Mann, Ultrapure) and 0.1% SDS [5,10]. (c) In an alkaline discontinuous boratesulfate system in the presence of 0.1% SDS [11]. The gels were stained for protein with Coomassie brilliant blue R-250 [9] and for glycoprotein with fuchsin-sulfite [12]. For the determination of radioactivity in gels, they were frozen on dry ice, immediately after electrophoresis, and sliced into sections 1mm thick. Each slice was incubated in 1 ml of 30% (v/v) H_2O_2 at 90°C for 1 hr prior to addition of 10 ml of Bray's liquid and counting in a Packard Tri-Carb scintillation spectrometer.

Ion exchange chromatography was performed at room temperature on a column (1 × 40 cm) of DEAE-cellulose (Whatman DE-52, microgranular, preswollen) in the presence of 8 M cyanate-free urea buffered with 0.04 M Tris–HCl pH 7.3 [6]. Protein in the eluted fractions was estimated spectrophotometrically at 280 nm.

Amino acid analysis was performed as previously described [1]. NH_2-Terminal amino acid determination was according to the dansyl chloride method of Gray [13] in 0.1 M sodium bicarbonate -8 M urea, pH 8.5 [1].

For sequence analysis, SBA (6 mg, 50 nmoles) was dissolved in *N,N*-dimethylbenzylamine and the sequencer (Beckman model 890C) was operated accor-

* Permanent address: Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, B.P. 36, 59 Villeneuve d'Ascq. France.

North-Holland Publishing Company – Amsterdam

ding to programme DMBA. The phenylthiohydantoin derivatives were identified by gas-liquid chromatography after silylation as well as on the amino acid analyzer after hydrolysis with hydroiodic acid (48% v/v in water) for 20 hr at 130°C.

3. Results and discussion

Electrophoresis of soybean agglutinin at pH 7.0 in the presence of 0.1% SDS [9] affords, as previously found [1], a single protein band (fig.1, gel 1) with a migration corresponding to a mol. wt. of 30 000. However, discontinuous gel electrophoresis at alkaline pH

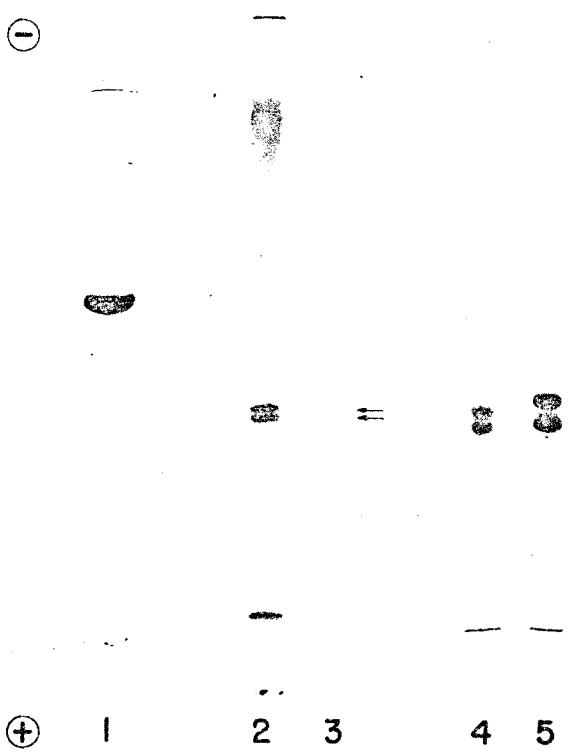


Fig.1. Polyacrylamide gel electrophoresis of soybean agglutinin on: 1, continuous pH 7.0 gel containing 0.1% SDS [9]; 2, discontinuous, alkaline, borate-sulfate gel containing 0.1% SDS [11]; 3, same as 2 but stained for glycoprotein [12]; 4, discontinuous pH 9.7 glycine gel containing 8 M urea and 0.1% SDS [5,10]; 5, same conditions as 4 only the lectin from *Dolichos biflorus* [5] was applied on the gel. Protein samples in the range 20–40 μg were used, at higher loads the separation into distinct bands (gels 2–4) was not efficient. Migration direction was from the top.

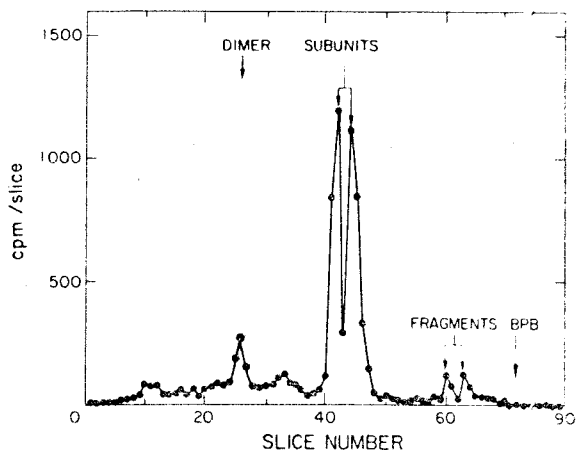


Fig.2. Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of [^{3}H] soybean agglutinin (15 μg, 15 000 cpm) on alkaline borate sulfate gel in the presence of 0.1% SDS. BPB-Bromophenol blue. The migration was from left (cathode) to right (anode).

(>9.0) in the presence of 0.1% SDS [11] or in the presence of 8 M urea and 0.1% SDS [5], separates two protein bands (fig.1, gels 2 and 4, respectively). In the latter gels the upper band was designated subunit I and the lowersubunit II. For comparison the electrophoretic pattern of the lectin from *Dolichos biflorus*, where a similar phenomenon was observed [5,6] is also given (fig.1, gel 5).

The two types of SBA subunit stained for glycoprotein (fig.1, gel 3) which indicates that both contain carbohydrate. This was further demonstrated by electrophoresis of radioactively labeled SBA on the discontinuous alkaline borate-sulfate gels. As can be seen in fig.2, the dissociated lectin gives two major radioactive bands which seem to be labeled to the same extent, suggesting that the ratio between the subunits is 1:1.

The location of the slow moving band (slices 24–28) and of the fast moving bands (slices 59–62 and 63–66), correspond to those of the subunit dimer (mol. wt. 60 000) and of the subunit fragments, previously described by us [14]. The presence of only one band of subunit dimer suggests that the tetrameric lectin is comprised of two types of subunit that associate in the form, I_2 II_2 rather than being a mixture of two types of tetramer I_4 and II_4 which would yield two types of subunit dimer upon partial dissociation.

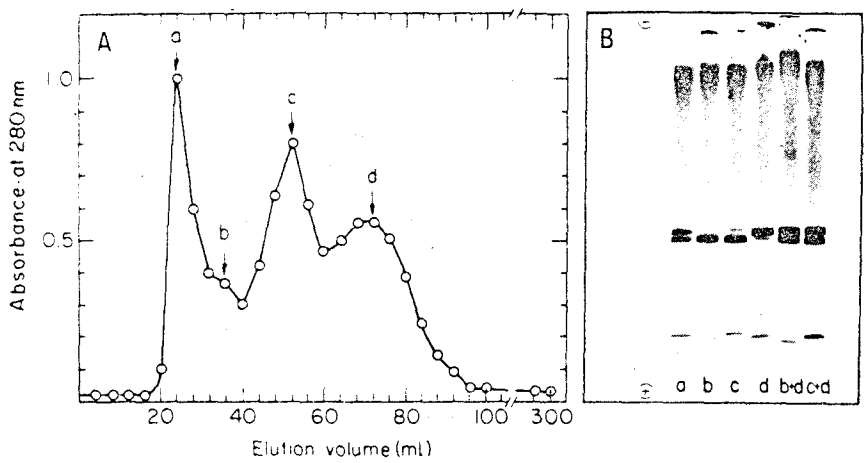


Fig.3. (A) Ion exchange chromatography of soybean agglutinin on DEAE-cellulose in 8 M urea pH 7.3. Soybean agglutinin (20 mg) was dissolved in 1 ml of 8 M urea in 0.04 M Tris-HCl pH 7.3 and applied on a column (1 × 40 cm) of DEAE-cellulose equilibrated in the same urea solution which was also used for elution of 2 ml fractions at a rate of 5 ml per hr. All operations were at 23°C. (B) Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis on alkaline borate-sulfate gels in the presence of 0.1% SDS [11] of soybean agglutinin fractions separated on DEAE-cellulose (fig.3,A). Samples of 30 μg protein were applied on each gel. In order to further demonstrate the separation of subunits by DEAE-cellulose, the recombined fractions b and d as well as c and d were also analysed by electrophoresis, here samples of 20 μg of each fraction were applied on the gels.

The two subunits stain with the same intensity for protein and for glycoprotein which also indicates that they are present in a 1:1 stoichiometry in the undissociated SBA.

Three protein peaks were eluted upon chromatography of SBA on DEAE-cellulose in the presence of 8 M urea (fig.3,A). The recovery of protein was 80–90% of that applied on the column and no additional protein could be eluted from the column by washing it with 1 M NaCl in 8 M urea.

Analysis of the protein fractions by discontinuous alkaline boratesulfate gel electrophoresis in the presence of 0.1% SDS [11] revealed that the first peak (fig.3,A peak a) contained the two subunits, the second peak (fig.3,A peak c) contained protein that co-electrophoresed with subunits II (compare with fig. 1, gels 2 and 4) and the third peak (fig.3,A peak d) contained protein which co-electrophoresed with subunit I. Upon rechromatography of peaks c or d under the same conditions as above, they emerged at the same position as before.

Attempts to renature the soybean agglutinin from the peaks separated by ion exchange chromatography were not successful, since upon dialysis of either peak or combinations of different peaks, the protein precipitated and could not be redissolved in buffers that did not contain either SDS or urea.

Attempts to fractionate SBA by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose in the presence of 8 M urea at pH 9.5 were unsuccessful, since all the protein was adsorbed to the column and could be eluted, as a single peak, with a linear NaCl gradient (0 to 10 mM) in 8 M urea.

Amino acid analysis of peak c (subunit II) (fig.3,A) and peak d (subunit I) revealed a great similarity. The only significant differences were an excess of one lysine residue in subunit I and an excess of two aspartic acid (or asparagine) and one glutamic acid (or glutamine) in subunit II.

NH_2-Terminal amino acid analysis of the isolated subunits revealed that alanine was the NH_2-terminal amino acid in both subunits. Ten cycles in the sequencer gave a single amino acid at each step and the sequence found was: Ala–Glu–Thr–Val–Ser–Phe–Asp–Trp–Phe–Glu.

The different migration of the subunits on discontinuous alkaline pH gel electrophoresis in the presence of 0.1% SDS alone or with 8 M urea and the failure of continuous pH 7.0 gel electrophoresis in the presence of 0.1% SDS to separate the subunits, suggests

that they differ in their ratio of charge to frictional coefficient [11]. This is in accord with the results of our previous studies on SBA subunits [1] in which no difference in their molecular weight could be observed.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from DGRST (no. P306), C.N.R.S. (A.T.P. Pharmacodynamie et Chimiothérapie) and Fondation pour la Recherche Médicale Française. N.S. is an established investigator of the Chief Scientists Bureau of the Israel Ministry of Health.

References

[1] Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H. and Sharon, N. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1219–1224.
[2] Lis, H., Sela, B. A., Sachs, L. and Sharon, N. (1970) Biochim. Biophys. Acta 211, 582–585.
[3] Olmsted, J. B., Witman, G. B., Carlson, K. and Rosenbaum, J. L., (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2273–2277.
[4] Wilson, L. and Bryan, J. (1974) in: Advances in Cell and Molecular Biology (DuPraw, E. J. ed), Vol. 3, pp. 21–72, Academic Press, New York.
[5] Carter, W. G. and Etzler, M. E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2756–2762.
[6] Carter, W. G. and Etzler, M. E. (1975) Biochemistry, in press.
[7] Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H. and Sharon, N. (1972) FEBS Lett. 24, 193–196.
[8] Lotan, R., Debray, H., Cacan, M., Cacan, R. and Sharon, N. (1975) 250, 1955–1957.
[9] Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406–4412.
[10] Wu, G. and Bruening, G. (1971) Virology, 46, 596–612.
[11] Neville, D. M. Jr., (1971) J. Biol. Chem. 246, 6328–6334.
[12] Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. (1969) Anal. Biochem. 30, 148–152.
[13] Gray, W. R. (1967) Method. Enzymol. 11, 139–151.
[14] Lotan, R., Lis, H. and Sharon, N. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 144–150.

REFERENCES

Les références incluses dans les articles se rapportent à la bibliographie située à la fin de chaque article et ne sont pas classées ci-dessous.

	Réf.	Page
ADAIR, W.L., KORNFELD, S. 1974, J. Biol. Chem., 249, 4696-4704	71	14
ADAMANY, A.M., KATHAN, R.H. 1969, Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 171-178	57 428	12 124
ALLAN, D., CRUMPTON M.J. 1973, Exp. Cell. Res., 78, 271-278	266	37
ALOJ, S.M., KOHN, L.D., LEE, G., MELDOLESI, M.F. 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 1053-1059	179	26
ANDO, S., KON, K., ISOBE, M., NAGAI, Y., YAMAKAWA, T. 1976, J. Biochem., 79, 625-632	19	6
ANDO, S., KON, K., ISOBE, M., YAMAKAWA, T. 1973, J. Biochem., 73, 893-895	38	8
ANSTEE, D.J., TANNER, M.J.A. 1974, Eur. J. Biochem., 45, 31-37	136	22
ANSTEE, D.J., TANNER, M.J.A. 1974, Biochem. J., 138, 381-386	137	22
AOYAGI, T., SUZUKI, J., NEROME, K., NISHIZAWA, R., TAKEUCHI, T., UMEZAWA, H. 1974, Biochem. Biophys. Res. Comm., 57, 271-278	157	24

	Réf.	Page
AOYAGI, T., SUZUKI, J., NEROME, L., NISHIZAWA, R. TAKEUCHI, T., UMEZAWA, H. 1974, Biochem. Biophys. Res. Comm., 57, 271-278	157	24
ARNOLD, D., HOMMEL, E., RESSE, H.J. 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm., 54, 100-107.	345	46
ARONSON, N.N., TAN, L.Y., PETERS, B.P. 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm., 53, 112-118	341	46
ASHWELL, G., MORELL, A.G. 1974, Adv. Enzymol., 41, 99-128	187	27
ASHWELL, G., MORELL, A.G. 1977, TIBS, April, 76-78	188	27
ATKINSON, P.H. 1975, J. Biol. Chem., 250, 2123-2134	285	41
ATKINSON, P.H., MOYER, S.A., SUMMERS, D.F. 1976, J. Mol. Biol., 102, 613	286	41
BALSAMO, J., LILIEN, J. 1975, Biochemistry, 14, 167-171	230	33
BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. 1970, J. Biol. Chem., 245, 6357-6365	336	46
BARCLAY, A.N., LETARTE-MUIRHEAD, M., WILLIAMS, A.F., FAULKES, R.A. 1976, Nature, 263, 563-567	146	22
BARTHOLOMEW , B.A., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S. 1973, J. Biol. Chem., 248, 5752-5762	396	51
BERNACKI, R.J., PORTER, C.W. 1978, J. Supramol. Struct., 8, 139-152	410	71

	Réf.	Page
BERNARD-GRIFFITHS, I., BETAIL, G., GODENECHE, D., COULET, M., HERZOG, C., BINET, J.L. 1976, Path. Biol., 24, 517-524	268	38
BEYER, C.F., BOWERS, W.E. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3590-3593	277	38
BHAVANANDAN, V.P., DAVIDSON, E.A. 1977, Biochim. Biophys. Acta, 57, 173-188	116	19
BISCHOFF, E., TRAN-THI, T.-A., DECKER, K.F.A. 1975, Eur. J. Biochem., 51, 353-361	237	34
BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B. 1975, J. Cell. Biol., 67, 835-851	378	51
BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B. 1975, J. Cell. Biol., 67, 852-862	379	51
BLUEMINCK, J.G., DE LAAT, S.W. 1973, J. Cell. Biol., 59, 89-108	288	41
BON, S., HUET, M., LEMONNIER, M., RIEGER, F., MASSOULIE, J. 1976, Eur. J. Biochem., 68, 523-530	243	34
BOSMANN, H.B. 1971, Biochem. Biophys. Res. Comm., 43, 1118-1124	213	31
BOSMANN, H.B. 1972, Biochim. Biophys. Acta, 279, 456-474	303	43
	326	44
	335	46
	337	46
BOSMANN, H.B., CASE, K.R., MORGAN, H.R. 1974, Exp. Cell. Res., 83, 15-24	309	43
	330	44
	348	46

	Réf.	Page
BOWLES, D.J., KAUSS, H. 1976, FEBS Lett., 66, 16-19	220	32
BRADY, R.O., FISHMAN, P.H. 1975, Biochim. Biophys. Acta, 355, 121-148	45	9
BROSSMER, R., BOHN, B. 1974, FEBS Lett., 42, 116-118	249	35
BUCK, C.A., WARREN, L. 1976, J. Cell. Physiol., 89, 187-200	282	40
BURRIDGE, K. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4457-4461	103	16
CACAN, R. 1974, Thèse de 3ème cycle ;Recherches préliminaires sur les membranes pericytoplasmiques de l'hépatocyte de Rat normal : étude sur les glycoprotéines, Université des Sciences et Techniques de Lille I	84	14
CAPUTTO, R., LELOIR, L.F., CARDINI, C.E., PALADINI, A. 1950, J. Biol. Chem., 184, 333	358	45
CARLSEN, S.A., TILL, J.E., LING V. 1976, Biochim. Biophys. Acta, 455, 900-912	255	35
CARLSEN, S.A., TILL, J.A., LING, V. 1977, Biochim. Biophys. Acta, 467, 238-250	256	36
CARTER, W.G., HAKOMORI, S.I. 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76, 299-308	67	13
CECCARINI, C., MURAMATSU, T., TSANG, J., ATKINSON, P.H. 1975, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3139-3143	91 109	16 17

	Réf.	Page
CERVÉN, E.	301	43
1977, Biochim. Biophys. Acta, 467, 72-85	323	44
	356	46
	415	79
CHANGEUX, J.P.	194	28
1975, Handbook of Psychopharmacology, 6, 235-301		
CHEN, W.W., LENNARZ, W.J.	363	47
1976, J. Biol. Chem., 251, 7802-7809	364	48
CHEN, W.W., LENNARZ, W.J.	366	47
1977, J. Biol. Chem., 252, 3473-3479		
CHEN, W.W., LENNARZ, W.J.	388	51
1978, J. Biol. Chem., 253, 5774-5779		
CHEN, W.W., LENNARZ,W.J.	389	51
1978, J. Biol. Chem., 253, 5780-5785		
CHIPOWSKY, S., LEE, Y.C., ROSEMAN, S.	203	30
1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2309-2312	407	64
CLOSS, O., SALTVEDT, E., OLSNES, S.	262	37
1975, J. Immunol., 115, 1045-1048		
CLOYD, M.W., BOLOGNESI, D.P., BIGNER, D.D.	149	22
1977, Cancer Res., 37, 922-930		
CLOYD, M.W., BOLOGNESI, D.P., BIGNER, D.D.	148	22
1977, Cancer Res., 37, 931-938		
CODINGTON, J.F., LINSLEY, K.B., JEANLOZ, R.W.	80	15
1975, Carbohyd. Res., 40, 171-182		
CODINGTON, J.F., SANFORD, B.H., JEANLOZ, R.W.	77	14
1972, Biochemistry, 11, 2559-2564		

	Réf.	Page
COHN, R.H., CASSIMAN, J.J., BERNFIELD, M.R. 1976, J. Cell. Biol., 71, 280-294	119 121	19 19
COOK, G.M.W., EYLAR, E.H. 1965, Biochim. Biophys. Acta, 101, 57-66	139	22
CUATRECASAS, P. 1973, Biochemistry, 12, 3547-3558	162	25
CUATRECASAS, P. 1973, Fed. Proc., 32, 1838-1846	172	25
CUATRECASAS, P., TELL, G.P.E. I973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 485-489	173	26
CUATRECASAS, P. 1974, Ann. Rev. Biochem., 43, 169-214	174	26
DATTA, P. 1974, Biochemistry, 13, 3987-3991	297 322	43 44
DEBRAY, H., MONTREUIL, J. 1978, Biochimie, 60, 697-704	85	14
DEMAN, J.J., BRUYNEEL, E.A., MAREEL, M.M. 1974, J. Cell. Biol., 60, 641-652	201	30
DEN, H., MALINZAK, D.A., ROSENBERG, A. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, 621-627	222	32
DePIERRE, J.W., KARNOVSKY, M.L. 1973, J. Cell. Biol., 56, 275-303	291	42
DEPPERT, W., WERCHAU, H., WALTER, G. 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 3068-3072	332	44
DEPPERT, W., WALTER, S. 1978, J. Supramol. Struct., 8, 19-39	334 402	44 54

	Réf.	Page
DEWALD, B., TOUSTER, O. 1973, J. Biol. Chem., 248, 7223-7233	391	51
DIEVARD, J.C., BOURRILLON, R. 1974, Biochim. Biophys. Acta, 345, 198-212	90	15
DIXON, J.F.P., O'BRIEN, R.L., PARKER, J.W. 1975, Exp. Cell. Res., 96, 383-387	276	38
DIXON, J.F.P., PARKER, J.W., O'BRIEN, R.L. 1976, J. Immunol., 116, 575-578	273	38
DODGE, J.T., MITCHELL, C., HANAHAN, D.J. 1963, Arch. Biochem. Biophys., 100, 119-130	417	120
DORNAND, J., REMINIAC, C, MANI, J.C. 1977, Biochimie, 59, 425-432	235	33
DUBOIS, M, GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. REBERS, P.A., SMITH, F. 1956, Anal. Chem., 28, 350-356	427	124
EBERT, W., ROELCKE, D., WEICKER, H. 1975, Eur. J. Biochem., 53, 505-515	144	22
ENEGREN, B.J., BURNESS, A.T.H. 1977, Nature, 268, 536-537	154	24
EVANS, W.H. 1974, Nature, 250, 391-394	63 236	13 34
EVANS, W.H., GURD, J.W. 1973, Biochem. J., 133, 189-199	61 233	12 33
EVANS, W.H., HOOD, D.O., GURD, J.W. 1973, Biochem. J., 135, 819-826	62	13

	Réf.	Page
FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H. 1971, Biochemistry, 10, 2606-2616	420	120
FIELD, M. 1974, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 3299-3303	165	25
FINDLAY, J.B.C. 1974, J. Biol. Chem., 249, 4398-4403	72	14
FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H., HEMMINKI, K. 1977, Eur. J. Biochem., 77, 319-323	94	16
FLEISCHER, B., FLEISCHER, S. 1969, Biochim. Biophys. Acta, 183, 265-275	375	49
FRANKS, D.J. 1976, CAN. J. Biochem., 54, 981-987	166	25
FRAZIER, W.A. 1976, TIBS, June, 130-133	218	32
FUKUDA, M., OSAWA, T. 1973, J. Biol. Chem., 248, 5100-5105	424	123
FUNAKOSHI, I., NAKADA, H., YAMASHINA, I. 1974, J. Biochem., 76, 319-333	81	14
FUNAKOSHI, I., YAMASHINA, I. 1976, J. Biochem., 80, 1185-1193	68	13
FURTHMAYR, H., TOMITA, M., MARCHESI, V.T. 1975, Biochem. Biophys. Res. Comm., 65, 113-121	422 425	122 123
GAHMBERG, C.G. 1971, Biochim. Biophys. Acta, 249, 81-95	15	5
GAHMBERG, C.G., HAKOMORI, S.I. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci., 70, 3329-3333	101	16

	Réf.	Page
GAHMBERG, C.G., HAKOMORI, S.I. 1973, J. Biol. Chem., 248, 4311-4317	12	5
GAHMBERG, C.G., HAKOMORI, S.I. 1974, Biochem. Biophys. Res. Comm., 39, 283-291	108	17
GAHMBERG, C.G., KIEHN, D., HAKOMORI, S.I. 1974, Nature, 248, 413-415	106	17
GARDAS, A. 1976, Eur. J. Biochem., 68, 177-183	32 33	8 8
GARDAS, A. 1976, Eur. J. Biochem., 68, 185-191	34 127 135	8 21 20
GARDAS, A., KÓSCIELAK, J. 1974, FEBS Lett., 42, 101-114	30	8
GARTNER, T.K., PODLESKI, T.R. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 70, 1142-1149	221	32
GELD, L.D., LERNER, A.M. 1965, Science, 147, 404-405	158	24
GINSBURG, V. 1972, Advan. Enzymol., 36, 131-147	124	20
GLICK, J.L., GITHENS, S. 1965, Nature, 208, 88	248	35
GLICK, M.C., RABINOWITZ, Z., SACHS, L. 1973, Biochemistry, 12, 4864-4869	97	16
GLICK, M.C., RABINOWITZ, Z., SACHS, L. 1974, J. Virol., 13, 967-974	98	16

	Réf.	Page
GOTTSCHALK, A., BHARGAVA, A.S., MURTY, V.L.N. in "Glycoproteins. Their composition, structure and function" Part B, Gottschalk, A.ed., 1972, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New-York, 810-829	49	10
GOTTSCHALK, A. 1972, in"Glycoprotéins " Gottschalk, A. ed., Part B, 1082-1096, Elsevier Publishing Company, Amsterdam	150	24
GRAHAM, J.M., SUMNER, M.C.B., CURTIS, D.H., PASTERNAK, C.A. 1973, Nature, 246, 291-295	280	39
GROS, D., OBRENOVITCH, A., CHALLICE, C.E., MONSIGNY, M., SCHREVEL, J. 1977, J. Histochem. Cytochem., 25, 104-114	10	5
GRÜNHAGEN, H.H., CHANGEUX, J.P. 1976, J. Mol. Biol., 106, 517-535	195	28
HADDEN, J.W., HADDEN, E.M., SADLIK, J.R., COFFEY, R.G. 1976, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1717-1721	265	37
HAGOPIAN, A., BOSMANN, H.B., EYLAR, E.H. 1968, Arch. Biochem. Biophys., 128, 387-396	347	46
HAKOMORI, S.I. 1969, Vox Sanguinis, 16, 478	42	9
HAKOMORI, S.I. 1975, Biochim. Biophys. Acta, 417, 55-89	46 48	9 10
HAKOMORI, S.I., ANDREWS, H.D. 1970, Biochim. Biophys. Acta, 202, 225-228	132	20
HAKOMORI, S.I., JEANLOZ, R.W. 1961, J. Biol. Chem., 236, 2827-2833	25	6

	Réf.	Page
HAKOMORI, S.I., KIJOMOTO, S., SIDDIQUI, B. 1972, in "Membrane Research" First ICN UCLA Symposium on Molecular Biology, Ed. Fox C.F., Academic Press, 253-277	44	9
HAKOMORI, S.I., SIDDIQUI, B., LI, Y.T., LI, S.C. HELLERQUIST, C.G. 1971, J. Biol. Chem., 246, 2271-2277	17	6
HAKOMORI, S.I., STRYCHARD, G.D. 1968, Biochemistry, 7, 1279-1286	26 131 126	6 20 21
HAKOMORI, S.I., TEATHER, C., ANDREWS, H. 1968, Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 563-568	43	9
HAKSUR, A., BANUIUKIEWICZ, S., PEWR, F.G. 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 959-966	175	26
HANFLAND, P. 1975, Chem. Phys. Lip., 15, 105-124	129	20
HARMS, E., REUTTER, W. 1974, Cancer Res., 34, 3165-3176	283	40
HARPAZ, N., FLOWERS H.M., SHARON, N. 1975, Arch. Biochem. Biophys., 170, 676-683	130	20
HAYWOOD, A.M. 1974, J. Mol. Biol., 83, 427-436	155	24
HAYWOOD, A.M. 1974, J. Mol. Biol., 87, 625-628	156	24
HEMMING, F.W. 1977, Biochem. Soc. Trans., 5, 1682-1687	380	51

	Réf.	Page
HEMMING, F.W. 1977, Biochem. Soc. Trans., 5, 1223-1231	381	51
HENKART, P., HUMPHREYS, S., HUMPHREYS, T. 1974, Biochemistry, 12, 3045-3050	228	33
HENNACHE, B., BOULANGER, P. 1977, Biochem. J., 166, 237-247	160	24
HICKMAN, J., NEUFELD, E.F. 1972, Biochem. Biophys. Res. Comm., 49, 992-999	191	28
HIRANO, H., PARKHOUSE, B., NICOLSON, G.L., LENNOX, E.S., SINGER, S.J. 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2945-2949	7	5
HOLLENBERG, M., FISHMAN, P.H., BENNETT, V., CUATRECASAS, P. 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 4224-4228	163	25
HOOVER, R.L. 1974, Exp. Cell. Res., 87, 265-276	344	46
HUDSON, J.E., JOHNSON, J.C. 1977, Biochem. J., 166, 217-223	284	40
HUGHES, R.C. 1975, Essays in Biochemistry, 11, 1-36	197	29
HUGHES, R.C. 1973, in "Progress in Biophysics and Molecular Biology" Butler,J.A., Noble, D., 191-268, Pergamon Press Oxford-New York	151	24
HUNT, R.C., BULLIS, C.M., BROWN, J.C. 1975, Biochemistry, 14, 109-115	75	14
HUNT, L.A., ETCHINSON, J.R., SUMMERS, D.F. 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 754-758	387	51

	Réf.	Page
HYNES, R.O. 1974, Cell, 1, 147-156	104	16
HYNES, R.O., HUMPHRYES, K.C. 1974, J. Cell. Biol., 62, 438-448	100	16
IRWIN, D., ANASTASSIADES, T.P. 1975, Can. J. Biochem., 53, 895-902	302 324 355	43 44 46
ISSELBACHER, K.J. 1974, Ann. Int. Med., 81, 681-686	293 312 339	43 42 46
JABBAL, I., SCHACHTER, H. 1971, J. Biol. Chem., 246, 5154-5161	394	51
JAMIESON, J.C. 1977, Can. J. Biochem., 55, 408-414	383	51
JAMIESON, G.A., URBAN, C.L., BARBER, A.J. 1971, Nature New Biol., 234, 5-7	212	31
JANCIK, J., SCHAUER, T. 1974, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 395-400.	190	27
JEAN, D.H., ALBERS, R.W. 1977, J. Biol. Chem., 252, 2450-2451	240	34
JETT, M., JAMIESON, G.A. 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm., 55, 1225-1233	76	14
JONES, M.N. 1976, FEBS Lett., 62, 21-24	198	29
KATHAN, R.H., WINZLER, R.J., JOHNSON, C.A. 1961, J. Exp. Med., 113, 37-45	153	24

	Réf.	Page
KAWASAKI, T., ASHWELL, G. 1976, J.Biol. Chem., 251, 5292-5299	69 70	13 13
KEENAN, T.W., HUANG, C.M., MORRE, D.J. 1972, Biochem. Biophys. Res. Comm., 47, 1277-1283	16	5
KEENAN, T.W., MORRE, D.J. 1975, FEBS Lett., 55, 8-13	333 404	44 57
KEMP, R.B. 1968, Nature, 218, 1255-1256	199	29
KHATRA, B.S., HERNIS, D.G., BREW, K. 1974, Eur. J. Biochem., 44, 537-560	395	51
KIEDA, C., DELMOTTE, F., MONSIGNY, M. 1977, FEBS Lett., 76, 257-261	9	5
KIELY, M.L., McKNIGHT, G.S., SCHIMKE, R.T. 1976, J. Biol. Chem., 251, 5490-5495	384	51
KLENK, E. 1935, Z. Physiol. Chem., 235, 24	40	9
KLENK, H.D., CHOPPIN, P.W. 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 66, 57-64	14	5
KLENK, E., WOLTER, H. 1952, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 291, 259-265	36	8
KNOX, R.B., CLARKE, A., HARRISON, S., SMITH, P., MARCHALONIS, J.J. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 2788-2792	224	32
KODAMA, T., TAKEICHI, N., GOTOHDA, E., KOBAYASHI, H. 1973, GANN, 64, 613-616	4	5
KOŚCIELAK, J., PIASEK, A., GÓRNIAK, H., GARDAS, A., GREGOR, A. 1973, Eur. J. Biochem., 37, 214-225	27 37 128	6 8 20

	Réf.	Page
KRAEMER, P.M. 1971, Biochemistry, 10, 1437-1445	112	17
KRAEMER, P.M., SMITH, D.A. 1974, Biochem. Biophys. Res. Comm., 56, 423-430	114	17
KRUSIUS, T., FINNE, J. 1977, Eur. J. Biochem., 78, 369-379	53	12
KRUSIUS, T., FINNE, J., RAUVALA, H. 1978, Eur. J. Biochem., 92, 289-300	401	51
KUBASOVA, T., VARGA, L., KÖTELES, G.J. 1974, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 9, 53-61	281	40
KUHNS, W.J., WEINBAUM, G., TURNER, R., BURGER, M.M. 1974, Ann. N.Y. Acad. Sci., 234, 58-74	227	33
LAMONT, J.T., GAMMON, M.T., ISSELBACHER, K.J. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 1086-1090	296 316 405	43 43 57
LAMONT, J.T., PERROTO, J.L., WEISER, M.M., ISSELBACHER, K.J. 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 3726-3730	298 317 403 416	43 44 55 119
LEE, G., ALOJ, S.M., BRADY, R.O., KOHN, L.D. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 73, 370-377	181	26
LEE, G., ALOJ, S.M., KOHN, L.D. 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm., 77, 434-441	182	26
LEIBMAN, A., AISEN, Ph. 1977, Biochemistry, 16, 1268-1272	193	28

	Réf.	Page
LENNARZ, W.J. 1975, Science, 188, 986-991	360 361	45 47
LIS, H., SHARON, N. 1973, Ann. Rev. Biochem., 42, 541-574	429	127
LOTAN, R., SIEGELMAN, H.W., LIS, H., SHARON, N. 1974, J. Biol. Chem., 249, 1219-1224	430	127
LOUVARD, D., SEMERIVA, M., MAROUX, S. 1976, J. Mol. Biol., 106, 1023-1035	245	34
LUNNEY, J., ASHWELL, G. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 341-343	189	27
MACA, R.D., HAKES, A. 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 1660-1666	327	44
MAKITA, A., SHIMOJO, H. 1973, Biochim. Biophys. Acta, 304, 571-574	113	17
MARCHALONIS, J.J. 1975, Science, 190, 20-29	258	37
MARCHALONIS, J.J., ATWELL, J.L., CONE, R.E. 1972, Nature New Biol., 235, 240-242	257	37
MARCHESI, V.T., ANDREWS, E.P. 1971, Science, 174, 1247-1248	54 418	12 120
MARCUS, D.M., CASS, L.E. 1969, Science, 164, 553-555	133	20
MARQUARDT, H., GILDEN, R.V., OROSZLAN, S. 1977, Biochemistry, 16, 710-717	147	22
MARSHALL, M.O. 1976, Biochim. Biophys. Acta, 455, 837-848	241	34

	Réf.	Page
MARTON, L.S.G., GARVIN, J.E. 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 1457-1462	421	120
MARX, R., GRAF, E., WESEMANN, W. 1973, J. Cell. Sci., 13, 237-255	2	5
MATSUMOTO, M., TAKI, J. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 472-476	28	8
McLEAN, R.J., BOSMANN, H.B. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 310-313	211 306 320 346	31 43 44 46
McMAHON, D. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2396-2400	214	32
MEAGER, A., BUTTERS, T.D., MAUTNER, V., HUGHES, R.C. 1976, Eur. J. Biochem., 61, 345-353	159	24
MEAGER, A., UNGKITCHANUKIT, A., HUGHES, R.C. 1976, Biochem. J., 154, 113-124	205	30
MELCHER, U., UHR, J.W. 1977, Biochemistry, 16, 145-152	259	37
MELDOLESI, M.F., FISHMAN, P.H., ALOJ, J.M., KOHN, L.D., BRADY, R.O. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4060-4064	178	26
MOLNAR, J., CHAO, H., MARKOVIC, G. 1969, Arch. Biochem. Biophys., 134, 533-538	354	46
MOLNAR, J., MARKOVIC, G., CHAO, H., MOLNAR, Z. 1969, Arch. Biochem. Biophys., 134, 524-532	376	49
MONAHAN, T.M., FRITZ, R.R., ABELL, C.W. 1976, Exp. Cell. Res., 103, 263-269	274	38

	Réf.	Page
MONAHAN, T.M., FROST, A.F., ABELL, C.W. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 73, 1115-1121	278	38
MONTREUIL, J. 1975, Pure Appl. Chem., 42, 431-477	50	10
MONTREUIL, J. 1979, Adv. Carb. Chem. (sous presse)	51	10
MONTREUIL, J., VLIEGENTHART, J.F.G. In Proc. 4 th Intern. Sym. Glycoconjugates, Woods Hole, 1977, Acad. Press Ed., New York (sous presse)	52	10
MOORE, W.V., FELDMAN, L. 1976, J. Biol. Chem., 251, 4247-4253	176	26
MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J., ASHWELL, G. 1971, J. Biochem. Chem., 246, 1461-1467	186	27
MORGAN, H.R., BOSMANN, H.B. 1974, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 1146-1149	310 331 349	43 44 46
MOSS, J., FISHMAN, P.H., MANGANIELLI, V.C., VAUGHAN, M., BRADY, R.O. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1034-1037	164	25
MOSS, J., FISHMAN, P.H., RICHARDS, R.L., ALVING, C.R., VAUGHAN, M., BRADY, R.O. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3480-3483	167	25
MULLIN, B.R., ALOJ, S.M., FISHMAN, P.H., LEE, G., KOHN, L.D., BRADY, R.O. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1679-1683	177	26

	Réf.	Page
MULLIN, B.R., FISHMAN, P.H., LEE, G., ALOJ, S.M., LEDLEY, F.D., WINAND, R.J., KOHN, L.D., BRADY, R.O. 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 842-846	180	26
MURAMATSU, T., KOIDE, N., CECCARINI, C., ATKINSON, P.H. 1976, J. Biol. Chem., 251, 4673-4679	92 110	16 17
MÜLLER, W.E.G., ARENDES, J., KURELEC, B., ZAHN, R.K., MÜLLER, I. 1977, J. Biol. Chem., 252, 3836-3842	229	33
MUTOH, S., FUNAKOSHI, I., YAMASHINA, I. 1976, J. Biochem., 80, 903-912	115	17
NAIKI, N., FONG, J., LEDEEN, R., MARCUS, D.M. 1975, Biochemistry, 14, 4831-4837	23	6
NAIKI, ., MARCUS, D.M. 1975, Biochemistry, 14, 4837-4841	134	20
NAKADA, H., FUNAKOSHI, I., YAMASHINA, I. 1975, J. Biochem., 78, 863-872	82	14
NARASIMHAN, S., STANLEY, P., SCHACHTER, H. 1977, J. Biol. Chem., 252, 3926-3933	392	51
NATHENSON, S.G., CULLEN, S.E. 1974, Biochim. Biophys. Acta, 344, 1-25	141 145	23 22
NERI, G., SMITH, D.F., GILLIAM, E.B., WALBORG, E.F. 1974, Arch. Biochem. Biophys., 165, 323-330	88	15
NEVILLE, D.M. 1971, J. Biochem., 246, 6328-6334	419	120

	Réf.	Page
NICOLSON, G.L., LACORBIERE, M. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1672-1676	204	30
NICOLSON, G.L., SINGER, S.J. 1971, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 942-945	6	5
NICOLSON, G.L., SINGER, S.J. 1974, J. Cell. Biol., 60, 236-248	8	5
NILSSON, S.F., WAXDAL, M.J. 1976, Biochemistry, 15, 2698-2705	74	14
NOVOGRODSKY, A. 1972, Biochim. Biophys. Acta, 266, 343-349	242	34
NOVOGRODSKY, A., KATCHALSKI, E. 1971, FEBS Lett., 12, 297-300	270	38
NOVOGRODSKY, A., KATCHALSKI, E. 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 3207-3210	271	38
NOVOGRODSKY, A., KATCHALSKI, E. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1824-1827	272	38
NOVOGRODSKY, A., KATCHALSKI, E. 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2515-2518	263	37
OGATA, S.I., MURATMATSU, T., KOBATA, A. 1976, Nature, 259, 580-582	93	16
OKUMURA, T., JAMIESON, G.A. 1976, J. Biol. Chem., 251, 5944-5949	64	13
OKUMURA, T., LOMBART, C., JAMIESON, G.A. 1976, J. Biol. Chem., 251, 5950-5955	65	13
OPPENHEIMER, S.B. 1974, J. Cell. Biol., 63, 251	231	33

	Réf.	Page
PAINTER, R.G., WHITE, A.	299	43
1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 837-841	325	44
	409	64
PALADE, G.E.	287	41
1959, in "Subcellular Particles", ed. T. Hayashi, Ronald, New York, p.64		
PARSONS, D.F., SUBJECK, J.R.	11	5
1972, Biochim. Biophys. Acta, 265, 85-113		
PATT, L.M., ENDRES, R.O., LUCAS, D.O., GRIMES, W.J.	315	43
1976, J. Cell. Biol., 68, 799-802	408	64
PATT, L.M., GRIMES, W.J.	294	43
1974, J. Biol. Chem., 249, 4157-4165	313	43
	351	46
	414	79
PATT, L.M., GRIMES, W.J.	295	43
1975, Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 483-490	314	43
PATT, L.M., GRIMES, W.J.	307	43
1976, Biochim. Biophys. Acta, 444, 97-107	328	44
PAULSON, J.C.	399	51
1978, J. Biol. Chem., 253, 5617-5624		
PAULSON, J.C., BERANEK, W.E., HILL, R.L.	397	51
1977, J. Biol. Chem., 252, 2356-2362		
PAULSON, J.C., REARICK, J.I., HILL, R.L.	398	51
1977, J. Biol. Chem., 252, 2362-2371		
PEPPER, D.S.	152	24
1964, Biochim. Biophys. Acta, 156, 317-326		

	Réf.	Page
PLESS, D.D., LENNARZ, W.J.	367	48
1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 134-138		
PODOLSKY, D.K., WEISER, M.M., LAMONT, J.T.,	238	34
ISSELBACHER, K.J.	304	43
1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 904-908	318	44
	342	46
PORTER, C.W., BERNACKI, R.J.	300	43
1975, Nature, 256, 648-650	321	44
PRESANT, C.A., KORNFELD, S.	86	15
1972, J. Biol. Chem., 247, 6937-6945		
PRESANT, C.A., PARKER, S.	275	38
1976, J. Biol. Chem., 251, 1864-1870		
PRICER, W.E., ASHWELL, G.	340	46
1971, J. Biol. Chem., 246, 4825-4833		
RAHMSDORF, H.J., CAILLA, H.L., SPITZ, E.,	216	32
MORAN, M.J., RICKENBERG, H.V.		
1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3183-3187		
RAMBOURG, A., LEBLOND, C.P.	5	5
1967, J. Cell. Biol., 32, 27-53		
REITHERMAN, R.W., ROSEN, S.D., FRAZIER, W.A.,	215	32
BARONDES, S.H.		
1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3541-3545		
REMOLD, H.G.	184	27
1973, J. Exp. Med., 138, 1065-1076		
RHEE, H.M., HOKIN, L.E.	239	34
1975, Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 1139-1145		
RICHARDSON, C.L., BAKER, S.R., MORRE, D.J., KENAN, T.W.	47	9
1975, Biochim. Biophys. Acta, 417, 175-186		

	Réf.	Page
ROBBINS, P.W., HUBBARD, S.C., TURCO, S.J., WIRTH, D.F. 1977, Cell., 12, 893-900	385	51
ROBINSON, J.M., SMITH, D.F., DAVIS, E.M., GILLIAM, E.B., CAPETILLO, S.C., WALBORG, E.F. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 72, 81-88	89	15
ROBLIN, R., ALBERT, S.O., GELB, N.A., BLACK, P.H. 1975, Biochemistry, 14, 347-357	118	19
ROCHE, A.C., PERRODON, Y., HALPERN, B., MONSIGNY, M. 1977, Eur. J. Immunol., 7, 263-267	261	37
RONIN, C., GRANIER, C., VAN RIETSCHOTEN, J., BOUCHILLOUX, S. 1978, Biochem. Biophys. Res. Comm., 81, 772-778	368	48
ROSEMAN, S. 1970, Chem. Phys. Lip., 5, 270-297	208	31
ROSEN, S.O., SIMPSON, D.L., ROSE, J.E., BARONDES, S.H. 1974, Nature, 252, 149-151	217	32
ROTH, S., McGUIRE, E.J., ROSEMAN, S. 1971, J. Cell. Biol., 51, 525-535	202	30
ROTH, S., McGUIRE, E.J., ROSEMAN, S. 1971, J. Cell. Biol., 51, 536-547	207	31
	209	31
	305	43
	319	44
	343	46
	406	64
ROTH, S., WHITE, D. 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 485-489	210	31

	Réf.	Page
ROTHMAN, J.E., LENARD, J. 1977, Science, 195, 743-753	289 290	41 41
ROTHSTEIN, A., CABANTCHIK, Z.I., KNAUF, P. 1976, Fed. Proc., 35, 3-10	251 252	6 35
SASAKI, T., ROBBINS, E.E. 1974, in "Biology and Chemistry of Eucaryotic cell surfaces (Lee E.Y.C. and Smith E.E., eds), 125-157, Academic Press New York	350	46
SCHACHTER, H. Conférence donnée lors de l'"EMBO Workshop" organisée à Lille du 19 au 30 septembre 1978 au Laboratoire de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq, France	377	51
SCHENGRUND, C.L., JENSEN, D.S., ROSENBERG, A. 1972, J. Biol. Chem., 247, 2742-2746	370	48
SCHENGRUND, C.L., LAUSCH, R.N., ROSENBERG, A. 1973, J. Biol. Chem., 248, 4424-4428	372	49
SCHENGRUND, C.L., ROSENBERG, A., REPMAN, M.A. 1976, J. Cell. Biol., 70, 555-561	373	49
SCHMELL, E., EARLES, B.J., BREAUX, C., LENNARZ, W.J. 1977, J. Cell. Biol., 72, 35-46	206	30
SEDLACEK, H.H., STÄRK, J., SEILER, F.R., ZIEGLER, W., WIEGANDT, H. 1976, FEBS Lett., 61, 272-276	168	25
SHAMOO, A.E., GOLDSTEIN, D.A. 1977, Biochim. Biophys. Acta, 472, 13-53	254	35
SHARIF, A., BOURRILLON, R. 1975, Cell. Immunol., 19, 372-380	269	38

	Réf.	Page
SHARON, N. Conférence donnée lors de l'"EMBO Workshop" organisée à Lille du 19 au 30 septembre 1978 au Laboratoire de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq, France	411	72
SHARON, N., LIS, H., LOTAN, R. 1974, Actes du Collo que International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, C.N.R.S. Paris 693-710	431	127
SHIER, W.T., LIN, Y., DE VRIES, A.L. 1975, FEBS Lett., 54, 135-138	250	35
SHUR, B.D., ROTH, S. 1975, Biochim. Biophys. Acta, 415, 475-512	357	45
SIDDIQUI, B., HAKOMORI, S.I. 1971, J. Biol. Chem., 246, 5766-5769	18	6
SIDDIQUI, B., HAKOMORI, S.I. 1973, Biochim. Biophys. Acta, 330, 147-155	21	6
SILMAN, I. 1976, TIBS, October, 225-227	244	34
SIMPSON, D.L., THORNE, D.R., LOH, H.H. 1976, Biochemistry, 15, 5449-5457	117	19
SIMPSON, D.L., THORNE, D.R., LOH, H.H. 1977, Nature, 266, 367-369	223	32
SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. 1972, Science, 175, 720-731	1	1
SLAYTER, H.S., CODINGTON, J.F. 1973, J. Biol. Chem., 248, 3405-3410	78	14

	Réf.	Page
SLOMIANY, A., SLOMIANY, B.L. 1977, Eur. J. Biochem., 76, 491-498	29	8
SLOMIANY, B.L., SLOMIANY, A. 1977, FEBS Lett., 73, 175-180	31	8
SMITH, D.F., WALBORG, E.F. 1972, Cancer Res., 23, 543-549	83	14
SPRINGER, G.F., CODINGTON, J.F., JEANLOZ, R.W. 1972, J. Natl. Cancer Inst., 49, 1469-1470	79	14
SPRINGER, G.F., TEGTMEYER, H., HUPRIKAR, S.V. 1972, Vox Sanguinis., 22, 325-343	140 142	23 22
STAHL, P., SCHLESINGER, P., RODMAN, J.S., DOEBBER, T. 1976, Nature, 264, 86-88	192	28
STANLEY, P., NARASIMHAN, S., SIMINOVITCH, ., SCHACHTER, H. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3323-3327	390	51
STECK, Th.L., DAWSON, G. 1974, J. Biol. Chem., 249, 2135-2142	13	5
STEFANOVIC, V., MANDEL, P., ROSENBERG, A. 1975, Biochemistry, 14, 5257-5260	246	34
STEFANOVIC, V., MANDEL, P., ROSENBERG, A. 1975, J. Biol. Chem., 250, 7081-7083	234	33
STEFANOVIC, V., MANDEL, P., ROSENBERG, A. 1976, J. Biol. Chem., 251, 493-497	247	34
STEINBERG, M.S., AMSTRONG, P.B., GRANGER, R.E. 1973, J. Membrane Biol., 13, 97-128	196	29

	Réf.	Page
STELLNER, K., HAKOMORI, S.I. 1974, J. Biol. Chem., 249, 1022-1025	22	6
STRUCK, D.K., LENNARZ, W.J. 1976, J. Biol. Chem., 251, 2511-2519	308 329 352 362 412 413	43 44 46 47 78 78
STRUCK, D.K., LENNARZ, W.J. 1977, J. Biol. Chem., 252, 1007-1013	365	47
SUNDSMO, J.S., HAKOMORI, S.I. 1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 68, 799-806	20	6
SUTHERLAND, E.W., ROBISON, G.A. 1966, Pharmacol. Rev., 18, 145	171	25
SVENNERHOLM, L. 1964, J. Lipid. Res., 5, 145-155	41	9
TABAS, I., SCHLESINGER, S., KORNFELD, S. 1978, J. Biol. Chem., 253, 716-722	386	51
TALLMAN, J.F., FISHMAN, P.H., HENNEBERRY, R.C. 1977, Arch. Biochem. Biophys., 182, 556-562	374	49
THOMAS, D.B., WINZLER, R.J. 1969, Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 811-818	56 58	12 12
TOMITA, M., MARCHESI, V.T. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 2964-2968	55	12
TONEGAWA, Y., HAKOMORI, S.I. 1977, Biochem. Biophys. Acta., 76, 9-17	111	17
TONELLI, Q., MEINTS, R.H. 1977, Science, 897-898	200	30

	Réf.	Page
TOYOSHIMA, S., FUKUDA, M., OSAWA, T. 1972, Biochemistry, 11, 4000-4005	87 264	15 37
TRAMS, E.G., LAUTER, C.J. 1974, Biochim. Biophys. Acta, 345, 180-197	232	33
TURNER, R.S., BURGER, M.M. 1973, Nature, 244, 509-510	225	33
UNDERHILL, C.B., KELLER, J.M. 1975, Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 448-454	120	19
VAHERI, A., RUOSLAHTI, E. 1974, Int. J. Cancer, 13, 579-586	102	16
VAN BEEK, W.P., SMETS, L.A., EMMELOT, P. 1973, Cancer Research., 33, 2913-2922	95	16
VAN DEN HAMER, C.J.A., MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J., ASHWELL, G. 1970, J. Biol. Chem., 245, 4397-4402	185	27
VAN HEYNINGEN, W.E. 1974, Bull. Inst. Pasteur, 72, 433-464	170	25
VAN HEYNINGEN, W.E. 1974, Nature, 249, 415-417	183	26
VAN HEYNINGEN, W.E., CARPENTER, C.C.J., PIERCE, N.F., GREENOUGH, W.B. 1971, J. Infect. Dis., 124, 415	161	25
VAN HEYNINGEN, W.E., MILLER, P.A. 1961, J. Gen. Microbiol., 24, 107-119	169	15
VISSER, A., EMMELOT, P. 1973, J. Membrane Biol., 14, 73-84	369	48

	Réf.	Page
VITETTA, E.S., UHR, J.W. 1975, Science, 189, 964-969	260	37
WAECHTER, C.J., LENNARZ, W.J. 1976, Ann. Rev. Biochem., 45, 95-112	359 382	45 51
WARREN, L., FUHRER, J.P., BUCK, C.A. 1973, Fed. Proc., 32, 80-85	96	16
WARREN, L., GLICK, M.C. 1968, J. Cell. Biol., 37, 729-746	279	39
WAŚNIOWSKA, K., DRZENIEK, Z., LISOWSKA, E. 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76, 385-390	143	22
WATANABE, K., MATSUBARA, T., HAKOMORI, S.I. 1976, J. Biol. Chem., 251, 2385-2387	24	6
WATKINS, W.M. 1966, Science, 152, 172-181	123 125	20 21
WAXDAL, M.J. 1974, Biochemistry, 13, 3671-3676	267	37
WEINBAUM, G., BURGER, M.M. 1973, Nature, 244, 510-512	226	33
WEISER, M.M. 1973, J. Biol. Chem., 248, 2542-2548	292 311 338	43 42 46
WEISS, L., SUBJECK, J.R. 1974, J. Cell. Sci., 14, 215-223	3	5
WHERRETT, J.R. 1973, Biochim. Biophys. Acta, 326, 63-73	39	8

	Réf.	Page
WILSON, J.R., WILLIAMS, D., SCHACHTER, H.	400	51
1976, Biochem. Biophys. Res. Comm., 72, 909-916	393	51
WINTERBURN, P.J., PHELPS, C.F.	122	19
1972, Nature, 236, 147-151		
WINZLER, R.J.	138	22
1970, in "Blood in Tissue Antigens" Aminoff D. ed.,		
117-126, Academic Press, New York, London		
WINZLER, R.J.	59	12
1972, in "Glycoproteins, their Composition. Structure	60	12
and Function" 2ème ed. Ed. Gottschalk, A., 1268	423	123
WOLOSIN, J.M., GINSBURG, H., CABANTCHICK, Z.I.	253	35
1977, J. Biol. Chem., 252, 2419-2427		
YAMADA, K.M., PASTAN, I.	107	17
1976, TIBS, October, 222-224		
YAMADA, K.M., YAMADA, S.S., PASTAN, I.	219	32
1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3158-3162		
YAMADA, K.M., YAMADA, S.S., PASTAN, I.	105	17
1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1213-1221		
YAMADA, K.M., WESTON, J.A.	66	13
1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 3492-3496	99	16
YAMAKAWA, T., SUZUKI, S.	35	8
1951, J. Biochem., 38, 199-212		
YAMASHINA, I., MAKINO, M.	426	124
1962, J. Biochem., 51, 359-364		

	Réf.	Page
YOGEESWARAN, G., LAINE, R.A., HAKOMORI, S.I. 1974, Biochem. Biophys. Res. Comm., 59, 591-599	353	46
YOHE, H.C., ROSENBERG, A. 1977, J. Biol. Chem., 252, 2412-2418	371	48
ZANETTA, J.P., GOMBOS, G. 1974, FEBS Lett., 47, 276-278	73	14