

50376
1986
255

50376
1986
255

N° d'ordre : 1371

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

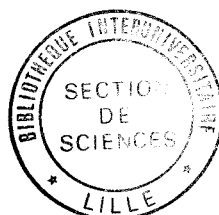
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Philippe CACHE



**DETERMINATION PAR RESONANCE MAGNETIQUE
NUCLEAIRE DU PROTON A 400 MHz DE LA
STRUCTURE PRIMAIRE DE 25
FUCOGLYCO-ASPARAGINES ISOLEES DU MECONIUM
DE NOUVEAU-NE ET D'URINE DE PATIENTS
ATTEINTS DE FUCOSIDOSE**

Soutenu le 9 Décembre 1986 devant la Commission d'Examen

Président :
Rapporteur :
Examineurs :

J. MONTREUIL
B. FOURNET
J. CARVER
G. STRECKER

Ce travail a été réalisé sous la direction de M. Gérard STRECKER, Directeur de Recherche au C.N.R.S., dans le Laboratoire de Chimie Biologique (*Directeur : Professeur Jean MONTREUIL*) de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE - Flandres - Artois (*Laboratoire national et unité associée au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure - fonction des constituants membranaires*). Il a bénéficié d'une aide du Ministère de la Recherche et de la Technologie (*Allocation de Recherche n° 538*).

à Miryam

à mes Parents

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

En m'acceptant au sein de votre Laboratoire, vous m'avez permis de réaliser ce travail.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur G. STRECKER

Gérard, tu m'as accueilli dans ton équipe, au sein de laquelle j'ai appris à me prendre en charge. Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance.

Ta compétence scientifique restera pour moi un exemple.

A Monsieur le Professeur B. FOURNET

Je suis honoré de votre présence dans ce Jury. Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt que vous voulez bien porter à ce travail.

A Monsieur J. CARVER

Sachant l'intérêt que vous portez aux études par R.M.N., je suis très honoré de votre présence parmi les Membres de mon Jury.

Soyez assuré de ma sincère gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à

M. J-M. WIERUSZESKI

pour la réalisation des analyses R.M.N. et pour ses conseils toujours précieux.

Qu'il soit ici assuré de mon amitié.

M. Y. LEROY

pour ses très précieux conseils dans la réalisation des analyses de C.L.H.P. et de C.P.G.

Mmes C. ALONSO et A. HONVAULT

pour leur collaboration et pour leur gentillesse toujours égale.

Mme J. CELEN

qui, avec gentillesse et une constante disponibilité, s'est chargée de la réalisation matérielle de ce document.

Je tiens à leur exprimer mes remerciements et ma sincère amitié.

Que tous ceux qui, à des titres divers, m'ont accordé leur aide et leur amitié soient ici remerciés.

ABREVIATIONS

Asn :	L-asparagine
Le ^a :	Lewis ^a
Le ^b :	Lewis ^b
Le ^x :	Lewis ^x
Fuc :	L-fucose
Glc :	D-glucose
Gal :	D-galactose
Man :	D-mannose
GlcNAc :	N-acétyl-D-glucosamine
GalNAc :	N-acétyl-D-galactosamine
NeuAc :	Acide-5-N-acétylneuraminique
Cer :	Céramide
CMP NeuAc :	Cytidine monophosphate-acide-5-N-acétylneuraminique
AMP :	Adénosine monophosphate
R.M.N.- ¹ H :	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
C.L.H.P. :	Chromatographie Liquide Haute Pression
H.P.L.C. :	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
G.C./M.S. :	Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
mM :	Millimolaire
μl :	Microlitre
μm :	Micromètre
nm :	Nanomètre
μg :	Microgramme
ppm :	Parties par million



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1

GENERALITES	2
- LE MECONIUM	2
I. LES SOURCES DU MECONIUM	2
II. LES CONSTITUANTS DU MECONIUM	3
A. L'EAU ET LES ELEMENTS MINERAUX	3
B. LES ENZYMES	3
C. LES PROTEINES PLASMATIQUES	3
D. LES GLYCOPROTEINES	4
1. <i>Les constituants glucidiques</i>	4
2. <i>Les substances inhibant l'hémagglutination virale</i>	5
3. <i>Substance à spécificité M,N</i>	5
E. LES LIPIDES	7
F. LES METABOLITES DE L'HEMOGLOBINE	7
G. LES STEROIDES ET LES ACIDES BILIAIRES	9
1. <i>Les stéroïdes</i>	9
2. <i>Les acides Biliaires</i>	9
H. LES STEROLS	9
III. LES DIFFERENTES STRUCTURES GLYCOLIPIDIQUES ET OLIGOSACCHARIDIQUES ISOLEES DU MECONIUM	10
A. LES STRUCTURES GLYCOLIPIDIQUES	10
B. LES STRUCTURES OLIGOSACCHARIDIQUES	10
1. <i>Les oligosaccharides acides</i>	12
2. <i>Les oligosaccharides neutres</i>	12
3. <i>Conclusion</i>	15
IV. CONCLUSION	15

- LES NEO-ANTIGENES	16
I. Introduction : IMPORTANCE DE LA GLYCOSYLATION	16
II. MODELE STRUCTURAL DE LA "GLYCOSYLATION ASSOCIEE AUX TUMEURS"	18
A. MODIFICATIONS RENCONTREES DANS LES GLYCOLIPIDES	18
1. La Synthèse bloquée	20
2. La Synthèse spécifique des cellules transformées	20
3. Passage de la synthèse d'une série à la synthèse d'une autre série	22
4. Changement dans l'organisation glycolipidique des membranes	22
B. MODIFICATIONS INTERVENANT DANS LES GLYCOPROTEINES	22
1. Les N-Glycosylprotéines	23
a. La polyantennarisation	23
b. L'hyperméthylation	23
c. L'hyperfucosylation	24
2. Les O-glycosylprotéines	24
C. CONCLUSION	24
III. LES NEO-ANTIGENES DEFINIS PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX ..	24
A. LES NEO-ANTIGENES GLYCOLIPIDIQUES	26
1. Exemple d'un antigène glycolipidique associé au cancer gastro-intestinal	26
2. Exemple d'anticorps monoclonaux dirigés contre la séquence X (Gal (B1-4) [Fuc (α1-3)] GlcNAc)	27
3. Discussion	27
B. LES NEO-ANTIGENES GLYCOPROTEINIQUES	27
IV. PROPRIETES DES NEO-ANTIGENES MARQUEURS DES CELLULES TUMORALES	29
A. EXEMPLE DE DETERMINANTS GLYCANNIQUES PORTES PAR LES GLYCOLIPIDES ET LES GLYCOPROTEINES	30
B. LES NEO-ANTIGENES MARQUEURS EXPRIMES SPECIFIQUEMENT DANS LES GLYCOLIPIDES	32
C. L'ANTIGENE X : Gal (B1-4) [Fuc (α1-3)] GlcNAc ET SES DERIVES MARQUEURS DE CELLULES TUMORALES	32
1. L'Haptène X déterminé dans les glycolipides	34
2. L'Haptène X dans les glycoprotéines	34

3.	<i>Conclusion</i>	38
D.	CONCLUSION GENERALE SUR LES MARQUEURS GLYCANNIQUES DES TUMEURS	38
V.	LES NEO-ANTIGENES ONCOFOETAUX	39
A.	EXPRESSION ANACHRONIQUE DES GLYCOLIPIDES DANS LES TUMEURS	39
B.	LES ANTIGENES GLYCANNIQUES ASSOCIES A LA DIFFERENCIATION	42
1.	<i>Les Antigènes basés sur la structure de Type II</i>	44
2.	<i>Les Antigènes basés sur la structure de Type I</i>	46
C.	CONCLUSION	47
VI.	LES BASES ENZYMATIQUES DE LA GLYCOSYLATION ABERRANTE DANS LES TUMEURS	48
A.	EXTENSION, FUCOSYLATION ET SIALYLATION DES GLYCANNES	49
B.	BIOSYNTHESE DES ANTIGENES ASSOCIES AUX CANCERS : <i>le sialyl LEWIS^a et le sialyl LEWIS^x</i>	51
1.	<i>Le Sialyl LEWIS^a</i>	51
2.	<i>Le Sialyl LEWIS^x</i>	51
C.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	53
- L'URINE DE FUCOSIDOSE		55
TRAVAUX PERSONNELS		57
- STRUCTURE PRIMAIRE DE TREIZE GLYCO-ASPARAGINES ISOLES DU MECONIUM HUMAIN		57
I.	MATERIELS ET METHODES	57
A.	MATERIELS	57
B.	PREPARATION DE LA FRACTION GLUCIDIQUE	57
C.	FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES	58
1:	<i>Chromatographie d'échange d'ions</i>	58
2.	<i>Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.)</i>	58
â.	<i>Principe</i>	58
b.	<i>Technique utilisée</i>	58
c.	<i>Résultats</i>	59

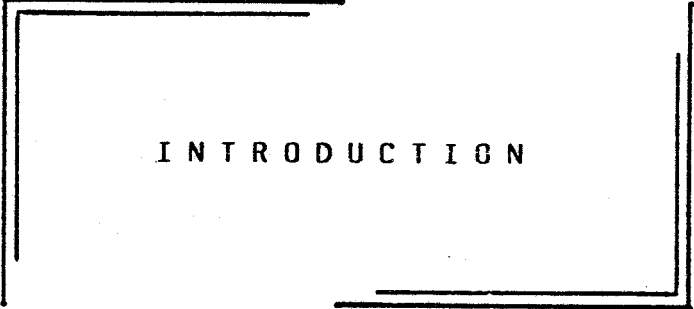
II.	ANALYSE R.M.N. DU PROTON A 400 MHZ	62
A.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	62
B.	RESULTATS	62
III.	DISCUSSION	80
-	ETUDE PAR R.M.N.- ¹ H A 400 MHZ ET PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE GLYCO-ASPARAGINES ISOLES D'URINE DE MALADES ATTEINTS DE FUCOSIDOSE	81
I.	MATERIELS ET METHODES	81
A.	MATERIELS	81
B.	PREPARATION DE LA FRACTION GLUCIDIQUE	81
C.	FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES	81
1.	<i>Chromatographie d'échange d'ions</i>	81
2.	<i>Chromatographie Liquide Haute Pression</i>	82
a.	<i>Technique utilisée</i>	82
b.	<i>Résultats</i>	82
3.	<i>Analyse par chromatographie couche mince</i>	82
4.	<i>Chromatographie Liquide Haute Pression de phase inverse</i>	85
a.	<i>Principe</i>	85
b.	<i>Technique utilisée</i>	85
c.	<i>Résultats</i>	85
D.	ETUDE DES GLYCO-ASPARAGINES	87
1.	<i>Etude par R.M.N.-¹H à 400 MHz des glyco-asparagines II à XVI</i>	87
2.	<i>Perméthylation des glyco-asparagines GP 6 à GP 9, GP 11 et GP 13</i>	87
II.	RESULTATS	87
A.	ETUDE PAR R.M.N.- ¹ H A 400 MHZ DES FRACTIONS II A XVI	87
1.	<i>Fraction II</i>	87

2. Fraction III	87
3. Fraction IV	90
4. Fraction V	90
5. Fractions VI, VII, VIII et IX	93
a. Fraction VI	93
b. Fraction VII	93
c. Fraction VIII	98
d. Fraction IX	98
6. Fraction XI	99
7. Fraction XII	101
8. Fractions XV et XVI	103
9. Note sur les paramètres R.M.N. des groupements H-1 et NAc de GlcNAc-2.....	106
 B. ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (G.C./M.S.) DES FRACTIONS GP 6 A GP 9, GP 11 ET GP 13	110
1. Le GP 6	110
2. Le GP 7	112
3. Le GP 8	112
4. Le GP 9	114
5. Le GP 11	114
6. Le GP 13	117
 III. CONCLUSION	117
 CONCLUSION GENERALE	118

 ADDENDUM	121
 I. LES GP 6 ET GP 10	121
II. LES GP 8 ET GP 13	124
A. Le GP 8	124
B. Le GP 13	124

III. LE GP 11	126
IV. CONCLUSION GENERALE	128

BIBLIOGRAPHIE



INTRODUCTION

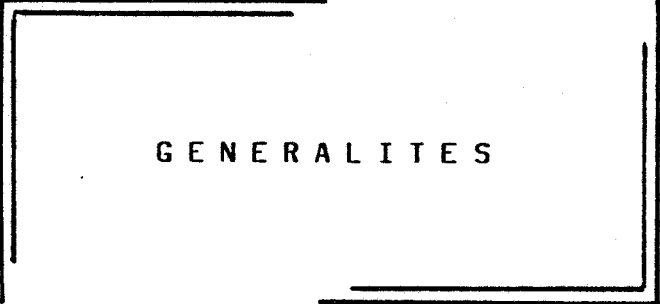
Les premiers fèces du nouveau-né ou **méconium** sont stériles. Ce milieu biologique renferme des quantités élevées d'oligosaccharides et de glycopeptides qui se trouvent en relation directe avec le métabolisme des antigènes tissulaires. Les études biochimiques réalisées sur le méconium ont permis d'isoler des substances à activité de groupes sanguins ABH, MN, Lewis, spécifiques à l'enfant. Ce matériel représente donc une importante source d'antigènes foetaux.

L'intérêt essentiel de l'étude de ce milieu consiste en la possibilité d'isoler certains constituants qui n'ont été caractérisés, jusqu'à présent, que dans des tissus foetaux ou dans certains tissus tumoraux.

En effet, dans les cellules transformées par virus ou dans les cellules cancéreuses, de nouvelles structures ou néo-antigènes apparaissent à la surface cellulaire. Ces structures -qui ne sont autres que les glycannes des glycoprotéines et des glycolipides présents à la surface membranaire- semblent être identiques, de par leur composition, aux glycannes isolés du méconium.

L'étude réalisée sur les urines de malades atteints de fucosidose entre dans le cadre de la détermination structurale de nouveaux composés glycopeptidiques. Ces structures, renfermant un ou plusieurs résidus de fucose, peuvent ainsi posséder l'activité antigénique X rencontrée dans de nombreux glycannes de cellules cancéreuses.

Nous avons entrepris d'élucider la structure primaire de glycannes d'origines foetale et urinaire d'une part, dans le but de connaître la réactivité vis-à-vis d'anticorps auto-immuns ou spécifiques de néo-antigènes et, d'autre part, dans le but de réaliser des néo-glycoprotéines en vue de l'obtention d'anticorps monoclonaux et de l'exploration immunologique des membranes cellulaires.



GENERALITES

LE MECONIUM

Le **méconium** se définit comme étant les premières selles que le nouveau-né excrète durant les 24 premières heures après la naissance.

Ce matériel stérile, visqueux, verdâtre et inodore est formé essentiellement de constituants glucidiques. Les lipides et les protéines sont présents en faible quantité. Sa couleur caractéristique est due aux pigments biliaires telle la bilirubine.

Parce qu'il est stérile, contrairement aux fèces, ses composants représentent des métabolites provenant de l'unité placentaire "mère-foetus". Le pH du méconium est de 6,1.

I. LES SOURCES DU MECONIUM

L'origine des composants du méconium n'est pas très précise. Toutefois, les deux sources les plus importantes semblent être le liquide amniotique et les sécrétions du tractus digestif du foetus. Les profils électrophorétiques des protéines du liquide amniotique et du méconium sont identiques, ce qui laisse suggérer que les protéines du méconium dérivent du liquide amniotique [YOUNG *et al.* (1)].

Le liquide amniotique contient des substances synthétisées par l'amnios, les sécrétions bronchiques du foetus, l'urine et la transsudation vasculaire maternelle.

Au quatrième mois de la gestation, le liquide amniotique, ingéré par 24 heures par le foetus, représente 10 % de son poids total. A terme, l'équivalent de liquide amniotique ingéré est supérieur à 500 ml [PRITCHARD (2)]. Cependant, la composition du méconium ne reflète pas précisément celle du liquide amniotique puisque celle-ci est modifiée par des activités enzymatiques lors du passage dans le tractus digestif foetal.

La bile, les sécrétions pancréatiques et intestinales contribuent également à la composition du méconium. Le foie foetal et la voie gastro-intestinale synthétisent des stéroïdes.

Par conséquent, le méconium est composé d'éléments d'origines biliaire et intestinale qui participent à la circulation entéro-hépatique [KINSELLA *et FRANCIS* (3)]. Les débris tissulaires rencontrés dans le méconium proviennent de cellules desquamées de la bouche, de la peau, du tractus digestif et du "vernix caseosa" [SMITH (4)].

Les protéines solubles du méconium, comme l'albumine, dérivent des sécrétions intestinales et du liquide amniotique [SCHUTT *et ISLES* (5)].

II. LES CONSTITUANTS DU MECONIUM

A. L'EAU ET LES ELEMENTS MINERAUX

La teneur moyenne en eau du méconium est de 76,4 % [HALL et O'TOOLE (6)]. Le méconium a une forte concentration en électrolytes, tel le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphate, le cuivre, le zinc, le fer et le manganèse [KOPITO et SHWACHMAN (7)].

B. LES ENZYMES

Les protéases (*trypsine, chymotrypsine, dipeptidases, protéases acides*), les glycosidases (*maltase, isomaltase, lactase, tréhalase*) et les enzymes lysosomiques (*phosphatases*) sont présents dans le méconium [SCHWARZ (8) ; SCHACHTER et DIXON (9) ; EGGERMONT (10) ; ANTONOWICZ et al. (11)].

Les endopeptidases, trypsine et chymotrypsine hydrolysent la plupart des protéines entrant dans la composition du méconium. Ces deux enzymes ont également une activité vis-à-vis des glycoprotéines du mucus intestinal, réduisant de ce fait la viscosité de celui-ci. Les enzymes sont probablement synthétisés dans le pancréas.

La fonction des glycosidases dans le méconium n'est pas connue mais elles peuvent induire la synthèse de glucides complexes par trans-glycosilation [KARLSON (12)].

C. LES PROTEINES PLASMATIQUES

5 à 10 % du poids sec total du méconium est composé de protéines plasmatisques et de débris tissulaires. Le poids sec restant est formé par les enzymes, les ions, les métabolites de l'hémoglobine, les stéroïdes, les stérols et les glycoprotéines du mucus. L'albumine constitue 0,11 % des protéines solubles [RULE et al. (13)].

Il est probable que les deux plus importantes sources de protéines plasmatisques proviennent du liquide amniotique et de sécrétions vers l'intestin foetal. De nombreuses protéines plasmatisques -exceptés les inhibiteurs protéiniques- sont dégradées par les enzymes protéolytiques.

L'IgG est présente dans le méconium tandis que les IgA et sIgA sont absentes [RULE et al. (14)].

RYLEY et al. (15), utilisant la technique d'immuno - électrophorèse croisée, identifient deux arcs de précipitation causés par l' α_1 antitrypsine et l' α_1 antichymotrypsine. En 1976, *RYLEY* (16) estime que les concentrations en mg/g de poids sec sont respectivement 48,4 et 4,0. Les mêmes auteurs trouvent que 5 % d'échantillons de méconium contiennent plus d'un milligramme d'albumine par gramme de poids sec. En revanche, la transferrine, la Gc-globuline, l' α_2 -Hs glycoprotéine et l'IgG sont détectées dans moins de 0,5 % d'échantillons de méconium.

GREEN et SHWACHMAN (17), à partir d'extraits aqueux de méconium, obtiennent deux bandes dans la région des α et des γ -globulines par électrophorèse sur acétate de cellulose.

D. LES GLYCOPROTEINES

1. Les constituants glucidiques

70 à 80 % de la matière sèche du méconium est composée de glycoprotéines du mucus. La fraction soluble du méconium contient 80 % des glucides totaux avec une proportion en monosaccharides similaire à celle du matériel de départ. Les monosaccharides composant les chaînes glycaniques sont : l'acide sialique, le fucose, le mannose, le galactose, la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine. Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin sont présentes dans le méconium et leur distribution est la même que celle trouvée chez l'adulte. La proportion est de 32,7 %, 8,4 %, 3,7 % et 42,1 % pour les groupes sanguins AH, BH, ABH et H respectivement [*FRASER et CLAMP* (18)]. Ces auteurs, étudiant la composition biochimique du méconium, isolent deux fractions glycoprotéiniques. La première de haut poids moléculaire ne contient pas de mannose tandis que la seconde de poids moléculaire plus faible en renferme. Les fractions contenant l'activité de groupe sanguin H ont un poids moléculaire plus faible que celles contenant les activités A ou B. Dans leur étude, un certain nombre de points laissent penser que les glycoprotéines contenant du mannose dérivent de l'épithélium de l'intestin foetal plutôt que du plasma maternel.

FRASER et CLAMP (18) démontrent que les glycoprotéines de haut poids moléculaire présentent de nombreuses chaînes glycaniques liées O-glycosidiquement et formées par les monosaccharides suivants : N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, galactose, acide sialique. La composition en acides aminés de ces glycoprotéines est caractéristique. La sérine et la thréonine sont les acides aminés essentiellement rencontrés dans la chaîne peptidique.

En revanche, les acides aminés soufrés et aromatiques sont absents.

Les glycoprotéines à mannose possèdent peu de chaînes glycaniques et ont une composition en acides aminés différente

En 1976, COTE et VALET (19) ont isolé et caractérisé du méconium des glycoprotéines neutres à activités A, B, AB, O et Lewis dont la composition en monosaccharides est donnée dans le tableau I p. 6. Ces glycoprotéines possèdent un noyau peptidique commun avec un rapport N-acétylglucosamine/N-acétylgalactosamine stable pour les matériels B, H, et Le^a et un rapport N-acétylglucosamine/galactose également stable pour les matériels A, H et Le^a.

Pour les substances à activité de groupe sanguin A B H, le rapport N-acétylglucosamine/somme (thréonine et sérine) est également stable.

Le taux de fucose varie dans les différentes glycoprotéines. Ce fait est inhérent à des facteurs génétiques.

De manière générale, les substances de groupe sanguin A, B, O sont très hétérogènes dans leur nature car portées soit par des glycoprotéines, soit par des glycolipides.

Enfin, l'activité Lewis^b n'apparaît pas aussi élevée que chez l'adulte. Une interprétation possible serait l'immaturité du système Lewis au niveau des sécrétions foetales, observation faite parallèlement avec les hématies [RACE et SANGER (20)].

2. Substances inhibant l'hémagglutination virale

ZILLIKEN (21), en 1957, isole du méconium une substance inhibant l'hémagglutination virale. Cet inhibiteur, riche en acide sialique, entre en compétition avec les récepteurs érythrocytaires pour l'adsorption des particules virales. Depuis, des mucines constituées d'environ 10 % de peptides et 90 % de sucres ont été isolées du méconium.

3. Substances à spécificité M,N

En 1966, SPRINGER *et al.* (22) extraient du méconium une glycoprotéine de poids moléculaire 520 000 daltons, ayant les propriétés sérologiques, biologiques et chimiques communes avec l'antigène érythrocytaire MN. Selon l'auteur, cet antigène isolé du méconium pourrait être un précurseur des substances N ou M.

SUCRES	GROUPES SANGUINS				
	A	B	AB	O	Le ^a
Fucose	9,9	9,3	11,4	12,2	4,8
Galactose	26,4	30,6	30,3	28,4	30,9
Glucosamine	16,8	17,1	15,8	17,8	18,9
Galactosamine	16,6	13,1	16,3	13,1	13,7
Acide neuraminique	0,8	0,8	0,8	1,3	1,3



Les résultats sont exprimés en g/100 g de glycoprotéines

Tableau I :

Composition en monosaccharides des glycoprotéines neutres
à Activité de groupe sanguin [COTE et VALET, 1976]

E. LES LIPIDES

Peu nombreux sont les travaux consacrés à l'étude de la composition lipidique du méconium. BERNARD et LINDLAR (23) évaluent le matériel lipidique, extrait à l'éther, à 8,7 %. Les acides gras peuvent être libres ou estérifiés. Ce sont des acides gras saturés (comme l'acide palmitique ou l'acide stéarique) ou insaturés.

Les lipides, quant à eux, associés aux substances de groupe sanguin [COTE (24), KARLSSON (25); PRIETO (26)], sont essentiellement des fucolipides.

La Fig. 1 p.8 reprend les différentes séries de glycolipides.

Dans le méconium, les glycosphingolipides non acides sont dominés par les cérébrosides et les fucolipides à activité de groupe sanguin. Les fucolipides majeurs comprennent des chaînes glycaniques penta- ou hexasaccharidiques mono- ou di-fucosylées.

Les glycosphingolipides de la série lacto. sont formés d'unités de répétition disaccharidiques (*hexose, hexosamine*) et substitués par un à trois résidus de fucose. Tout ce matériel représente une importante source d'antigènes foetaux.

La présence des globotriosylcéramides et des globotétracosylcéramides dans le méconium a pour origine les cellules épithéliales foetales.

Quant aux phospholipides, le méconium en est dépourvu.

F. LES METABOLITES DE L'HEMOGLOBINE

Ce sont des pigments biliaires, comme la bilirubine et les porphyrines. Il existe au moins quatre porphyrines dans le méconium : la coproporphyrine I, la protoporphyrine ainsi que deux autres, caractérisées par leur spectre d'absorption dans la bande 400-410 nanomètres. Ces deux dernières porphyrines ont une absorbance maximale de 405-406 nm et 410-411 nm. Une de ces porphyrines (410-411 nm) a été désignée comme la porphyrine S-411 et serait un dérivé monoacylique de la coproporphyrine III, dans lequel un groupe propionate est remplacé par un groupe acrylate [FRENCH *et al.* (27)].

Ces porphyrines dérivant du métabolisme endogène de la bile foetale, pourraient être des intermédiaires de l'hème porphyrinique.

Basic structures	
Galactosylceramide	Gal β 1-1Cer
Glucosylceramide	Glc β 1-1Cer
Lactosylceramide	Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Globo series	
Globotriaosylceramide (P ^a -antigen)	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Globotetraosylceramide (P-antigen)	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Forsman	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Lacto series	
Lactotriaosylceramide	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Lactotetraosylceramide	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Lactoneotetraosylceramide (paragloboside)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Sialosylparagloboside	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Lactonorhexaosylceramide (i-antigen)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Blood group H ₁	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Lactoisooctaosylceramide (I-antigen)	
	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Blood group H₂	
	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
	Fuc α 2-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Ganglio series	
Gangliotriaosylceramide (asialo G _{M2})	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Gangliotetraosylceramide (asialo G _{M1})	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{M3} (hematoside)	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{M2}	GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{M1a}	Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{D1a}	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{D1b}	Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
T _{T1b}	Neu2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
G _{D1b}	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer

* Abbreviations: Gal, D-galactose; Glc, D-glucose; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; NeuAc, N-acetyl-neuraminic acid; Cer, ceramide (N-acylsphingosine).

Fig. 1 :

Structure des différentes séries de glycolipides
[MARCUS (28)]

G. LES STÉROIDES ET LES ACIDES BILIAIRES

1. Les stéroïdes

Plus de trente stéroïdes ont été caractérisés dans le méconium et sont généralement présents à l'état de traces [GUSTAFSSON et STENBERG (29) ; KINSELLA et FRANCIS (3)]. La grande majorité est excrétée soit sous forme mono-sulfate, soit sous forme di-sulfate et les concentrations sont respectivement de 430 et 470 $\mu\text{g/g}$ de méconium. Ces produits sont ceux mis en évidence dans les tissus et les milieux liquides du fœtus et du nouveau-né. Ils représenteraient des métabolites terminaux excrétés comme tels dans le tractus gastro-intestinal où ils se concentreraient tout au long de la vie fœtale. Toutefois, aucune différence n'est à souligner entre le méconium du sujet masculin et celui du sujet féminin.

2. Les acides biliaires

Deux acides biliaires primaires (*cholate* et *chénohydrocholate*) et secondaires (*déoxycholate* et *lithocholate*) ont été identifiés dans le méconium [SHARP *et al.* (30)]. Les acides biliaires secondaires sont absents de la bile fœtale ainsi que des selles des nouveaux-nés. Les acides biliaires secondaires sont synthétisés par les systèmes enzymatiques bactériens de la lumière intestinale. Le méconium étant stérile, ces acides sont d'origine maternelle et parviennent au fœtus par voie placentaire.

H. LES STÉROLS

Les stérols retrouvés en grande quantité sont le cholestérol et le squalène qui tous deux existent sous forme libre ou estérifiée.

D'autres stérols, comme le 7-déhydrocholestérol ou les desmostérol, ont été identifiés [KINSELLA et FRANCIS (3)]. L'origine des stérols, libres ou estérifiés, du méconium n'est pas connue avec précision. Les stérols proviendraient en partie du vernix caseosa et de cellules épithéliales desquamées, ingérées par le fœtus avec le liquide amniotique. Toutefois, une origine maternelle ne peut être exclue.

L'importance toute relative du squalène semble confirmer l'hypothèse d'une synthèse accrue de ce produit durant la vie fœtale.

III. LES DIFFERENTES STRUCTURES GLYCOLIPIDIQUES ET OLIGOSACCHARIDIQUES ISOLEES DU MECONIUM

A. LES STRUCTURES GLYCOLIPIDIQUES

KARLSSON *et* LARSON (25) ont isolé du méconium un mélange de glycolipides riches en fucose. Ils ont identifié, par spectrométrie de masse, un tétraglycosylcéramide, qui serait un précurseur des fucolipides à activité de groupes sanguins.

Un lactotétraosylcéramide (Fig. 2, p.11) a été isolé du méconium humain d'un sujet de groupe sanguin O [KARLSSON *et* LARSON (31)]. Au regard de la voie de synthèse de déterminants de groupe sanguin de WATKINS *et* MORGAN (32), ce glycolipide serait un précurseur des antigènes glycolipidiques Le^a et Le^b.

Pour certains auteurs, ce lactotétraosylcéramide est seulement un produit de dégradation d'un glycolipide complexe de chaîne plus longue. Or, il semble que ce composé ne soit pas un produit de dégradation mais plutôt un glycosphingolipide naturel de la cellule épithéliale du fœtus.

NILSSON *et al.* (33) ont isolé du méconium humain le nouveau type de lactoganglioside possédant le résidu [*NeuAc* (Q2-6) *Gal*] terminal et émettent l'hypothèse d'une activité différente des sialyltransférases chez le fœtus par rapport à l'adulte. En 1985, PRIETO *et* SMITH (26) ont isolé du méconium un nouveau ganglioside du méconium humain (Fig. 3, p.11).

Le méconium, étant produit durant une grande partie de la vie fœtale, les glycolipides représentent une importante source d'antigènes fœtaux exprimés transitoirement. Ce sont donc des antigènes oncofœtaux, souvent identiques aux néo-antigènes des cellules cancéreuses.

B. LES STRUCTURES OLIGOSACCHARIDIQUES

Les oligosaccharides présents dans le méconium proviennent du catabolisme des glycoprotéines synthétisées durant la vie fœtale. Une centaine d'oligosaccharides différents sont présents dans le méconium.

Gal (β 1-3) GlcNac (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc (β 1-1) Céramide

Fig. 2 :

**Lactot traosylc ramide isolé du Méconium
(KARLSSON et LARSON, 1979)**

Neu Ac (α 2-6)

Gal (β 1-3) GlcNac (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc (1-1) Céramide

Fig. 3 :

**Monosialoganglioside isolé du Méconium
(PRIETO et SMITH, 1985)**

1. Les Oligosaccharides acides

HERLANT-PEERS et al. (34) ont isolé sept oligosaccharides acides dont les structures sont données Fig. 4 p.13. Ces structures dérivent du catabolisme des glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique et possèdent un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. Les sialyloligosaccharides isolés du méconium sont identiques à ceux des tissus et des urines de patients atteints de sialidose [STRECKER et al. (35)] et résultent vraisemblablement de l'action d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sur des sialylglycopeptides [PIERCE et al. (36)].

2. Les Oligosaccharides neutres

En 1981, HERLANT-PEERS et al. (34) ont isolé du méconium huit oligosaccharides dont les structures sont représentées Fig. 5, p.14. Les oligosaccharides N-1, N-2, N-3, N-5, N-6 dérivent du catabolisme de glycannes liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique. Ceci implique, dans le catabolisme des glycoprotéines de type mucine, l'action d'une endo-N-acétyl- α -D-galactosaminidase, d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase et d'une endo- β -D-galactosidase. L'oligosaccharide N-3 possède le déterminant antigénique X caractérisé par l'unité [Fuc (α 1-3) GlcNAc].

HOUNSELL et al. (37), en 1985, ont établi la structure de neuf oligosaccharides isolés du méconium. Ces oligosaccharides de type O-glycosidique sont représentés Fig. 6, p. 14.

Les oligosaccharides N 1 et R 1 présentent le déterminant antigénique de groupe sanguin T [Gal (β 1-3) GalNAc] alors que l'oligosaccharide T possède celui de l'antigène Tn. Ces antigènes sont des antigènes associés aux tumeurs caractéristiques de certains adénocarcinomes [PICARD et FEIZI (38) ; (39)]. Les deux structures N 1 et O3 contiennent le déterminant antigénique [Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-6)] reconnu par l'anticorps Ma à activité anti I [FEIZI et al. (40) ; ROVIS et al. (41)].

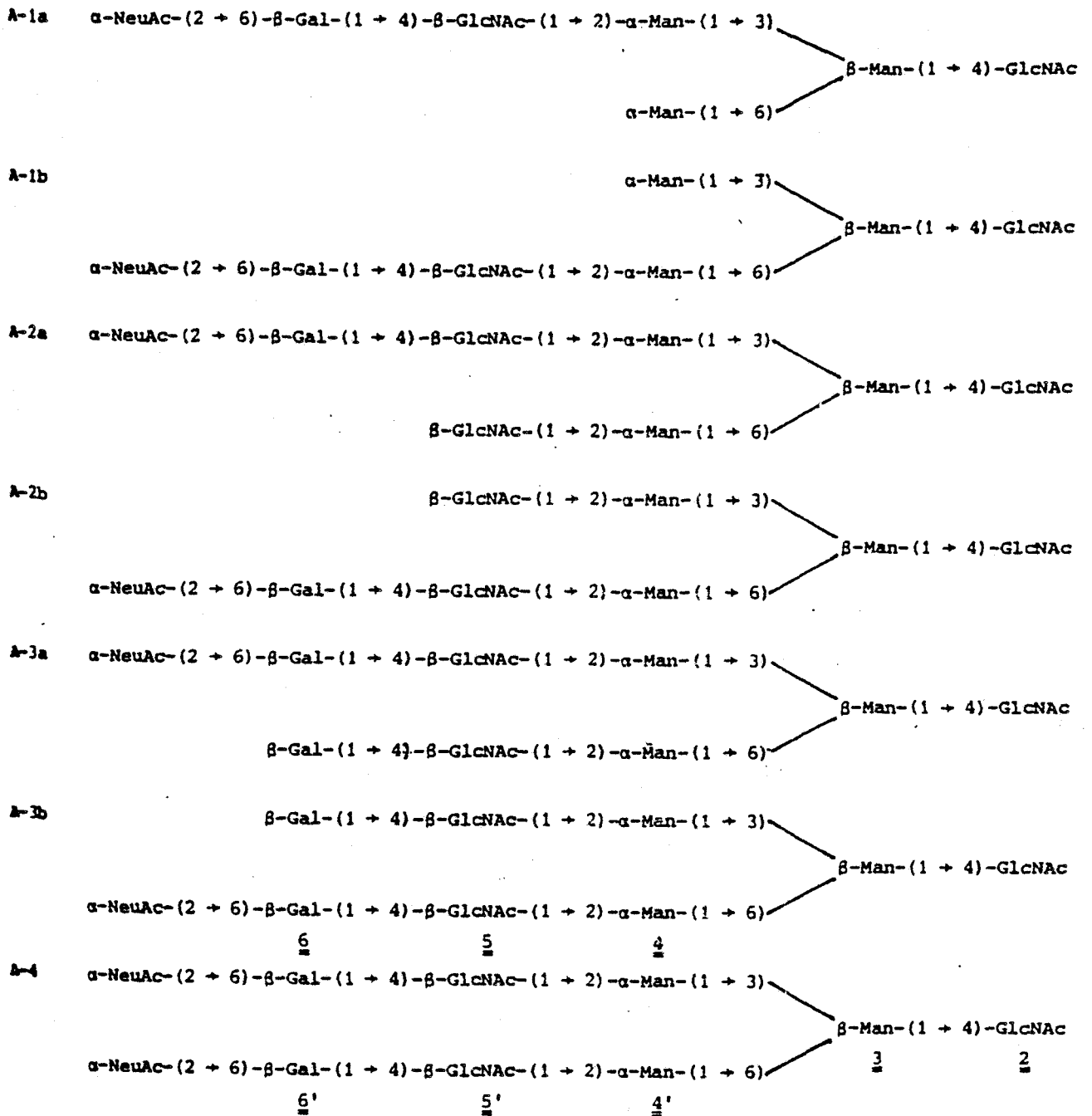


Fig. 4 :

Les Oligosaccharides acides isolés du méconium
 [HERLANT - PEERS, 1981]

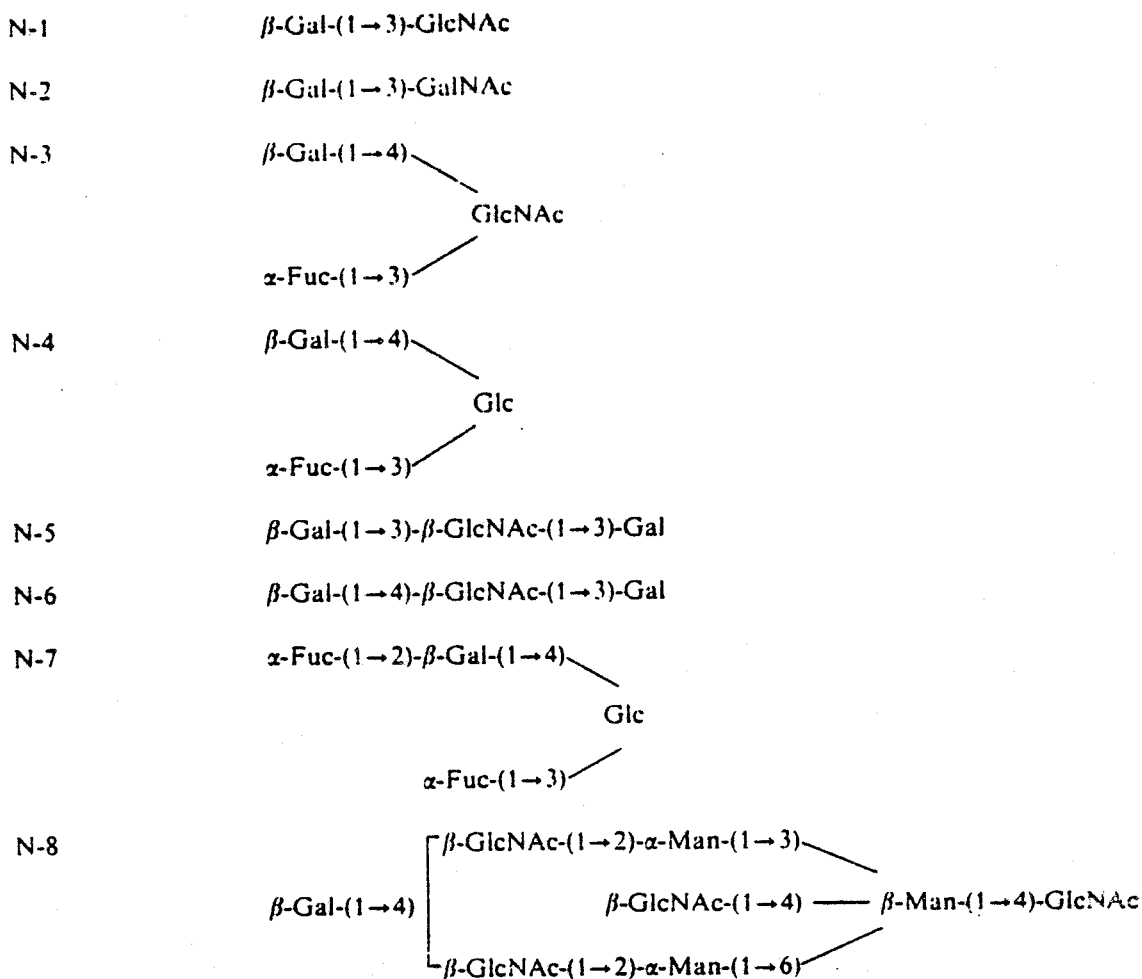


Fig. 5 . . :

Les Oligosaccharides neutres isolés du méconium
[HERLANT - PEERS, 1981]

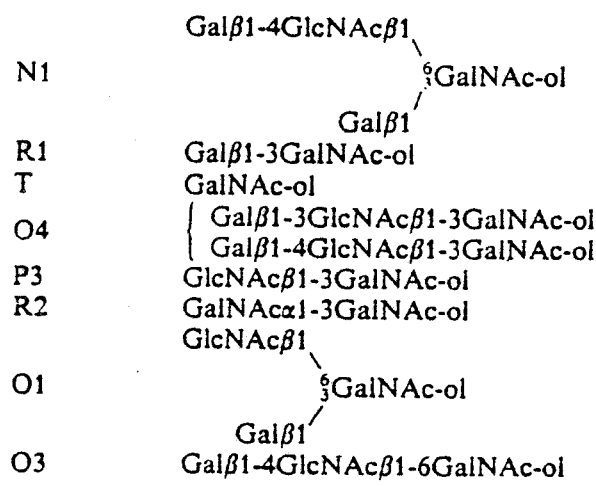


Fig. 6 :

Structure des Oligosaccharides isolés du méconium
[HOUNSELL, 1985]

3. Conclusion

Ces différentes structures oligosaccharidiques ne sont en fait que le "noyau structural" d'oligosaccharides plus importants et de glycopeptides. Ces structures, présentant une certaine activité antigénique, sont reconnues soit par des anticorps naturels, soit par des anticorps monoclonaux et peuvent être considérées comme des antigènes onco-foetaux.

IV. CONCLUSION

Le méconium est une source importante de glycoprotéines et de glycolipides immunologiquement actifs. Ces structures contiennent de nombreux antigènes que l'on retrouve associés aux tumeurs et reconnus soit par des anticorps naturels, soit par des anticorps monoclonaux obtenus par la technique d'hybridation.

Le méconium humain est donc un milieu de choix quant à la recherche des antigènes onco-foetaux.

De plus, le méconium, facile à obtenir, constitue un bon matériel de base pour l'obtention d'oligosaccharides et de glycopeptides de référence destinés à des études d'ordre biologique, chimique et physique.

LES NEO - ANTIGENES

Les cellules subissent des modulations fonctionnelles par deux types de modification chimique principale à savoir : la phosphorylation et la glycosylation des protéines, des enzymes et des lipides membranaires.

De nombreux groupes ont porté leur effort sur la phosphorylation, considérée comme le mécanisme essentiel du fonctionnement cellulaire laissant la glycosylation au second plan.

Or, les changements dans la glycosylation des protéines et des lipides membranaires interviennent aussi rapidement et de façon aussi drastique que ceux de la phosphorylation aux différents stades de la différenciation, du développement et de l'oncogénèse [HAKOMORI (42)].

I. Introduction : IMPORTANCE DE LA GLYCOSYLATION

Plus de cent types de structures glycosylées ont été caractérisés dans les glycolipides. Des variations similaires de glycosylation ont été identifiées dans les glycoprotéines en ajout des variations normales consécutives aux types de liaisons N- ou O-glycosidique.

La glycosylation affecte la conformation, la localisation et l'organisation des protéines structurales et fonctionnelles du cytoplasme, des membranes et de la matrice extracellulaire. La glycosylation des lipides membranaires donne des sites de reconnaissance cellulaire et permet la régulation de la fonction des protéines membranaires, tels les protéines responsables de l'adhérence cellulaire, de la reconnaissance intercellulaire et les récepteurs. Le tableau II p. 17 résume l'importance biologique de la glycosylation.

Au vu de l'importance de la glycosylation, nous allons nous efforcer de présenter dans cette partie le modèle des chaînes glycaniques présentes dans les membranes de cellules tumorales et la relation avec la formation "d'antigènes associés aux tumeurs". Nous verrons ensuite les conséquences biologiques et immunologiques d'une glycosylation anormale.

Glycosylation des lipides

1. confère sa stabilité à la membrane
2. régule la fonction des protéines membranaires (*récepteurs, protéines responsables de l'adhésion etc ...*)
3. intervient dans la vie sociale de la cellule, l'interaction avec différents ligands (*anticorps, toxines, bactéries, lectines virales et cellulaires*)

Glycosylation des protéines

1. maintient la conformation des protéines
2. influe sur le taux de dégradation des protéines (*régulation du "turnover"*)
3. détermine la localisation, la mobilité et l'organisation des protéines internes à la cellule
4. intervient dans la vie sociale de la cellule

Tableau II :

Importance Biologique de la Glycosylation

Ce concept de glycosylation anormale associée aux cancers est fondé sur l'étude des épitopes glycolipidiques. En effet, des changements dans la composition et le métabolisme des glycolipides ont été observés non seulement dans les cellules transformées par voie chimique ou virale mais également dans les tumeurs spontanées incluant une large variété des cancers humains [HAKOMORI et MURAKAMI (43)]. De tels épitopes établissant ainsi une discrimination entre les tissus normaux et tumoraux, ont été décelés dans les glycoprotéines.

II. MODELE STRUCTURAL DE LA "GLYCOSYLATION ASSOCIEE AUX TUMEURS"

Toutes les cellules tumorales présentent des structures et des profils glycaniques différents de ceux des cellules originales. Deux groupes chimiques distincts présentent d'importantes modifications dans les cellules tumorales. Ce sont d'une part les glycanes liés aux céramides (*glycolipides* ou *glycosphingolipides*) insérés dans la double couche lipidique des membranes et d'autre part les glycanes liés aux protéines de la surface cellulaire.

Toutefois, l'hétérogénéité des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines rend difficile l'étude de leurs épitopes dont l'antigénicité peut être altérée durant l'isolement.

En revanche, les glycolipides sont purifiés d'une manière homogène et leurs structures ainsi élucidées conservent leur antigénicité.

Depuis une quinzaine d'années, les études biochimiques réalisées ont permis d'élucider les changements intervenant dans les glycoconjugués des cellules tumorales en comparaison de ceux des cellules normales.

A. MODIFICATIONS RENCONTREES DANS LES GLYCOLIPIDES

Quatre types de modifications dans les glycolipides ont été trouvés associés à la transformation cancéreuse [HAKOMORI (44)] : la synthèse incomplète, la synthèse spécifique des cellules transformées, le passage de la synthèse de glycolipides d'une série à une autre et le changement de l'organisation des glycolipides dans les membranes.

Le tableau III p. 19 désigne les glycosphingolipides utilisés dans le texte ainsi que leur structure.

Classes	Abbreviation	Trivial name	Structure
Simple basic structures	GlcCer*	GlucosylCer	Glcβ1→1Cer
	GalCer*	GalactosylCer	Galβ1→1Cer
	FucCer*	FucosylCer	Fucal→1Cer
Globo series	LacCer*	LactosylCer	Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Gb ₃ *	GlobotriaosylCer	Galol→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
Lacto series	Gb ₁ *	Globoside	GalNAcβ1→3Galβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Gb ₂ *	Forsmann	GalNAcβ1→3Galβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Gb ₃ *	Forsmann	GalNAcβ1→3Galβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Lc3*	LactotriaosylCer	GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Lc4*	LactotetraosylCer	Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	nLc4*	LactoneotetraosylCer (paragloboside)	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	nLc6*	LactonhexaosylCer	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	nLc8*	LactonoctaosylCer	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Xf	Lactofucopentaosyl(III)Cer	Galβ1→4Fucal→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Lc†	Lactofucopentaosyl(II)Cer	Galβ1→4Fucal→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
Hf†	Lactofucopentaosyl(IV)Cer	Fucal→2Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
Hf†	—	Fucal→2Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
Ganglio series	Hf†	—	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	—	Sialosyl paragloboside	Galβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	—	Type 1 chain (as in Lc4, Lc*)	Galβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
Ganglio series	—	Type 2 chain (as in nLc4, nLc6, X, H ₁ , H ₂ , H ₃)	Galβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Gg ₁ *	Asialo GM ₁	GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	Gg ₂ *	Asialo GM ₁	Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GM ₁ †	Hematoside	Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GM ₂ †	—	GalNAcβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GM ₃ †	—	SA2→3Galβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GM ₄ †	—	Galβ1→3GalNAcβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GM ₅ †	—	SA2→3Galβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GD ₁ †	—	Galβ1→3GalNAcβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GD ₂ †	—	SA2→3Galβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GD ₃ †	—	Galβ1→3GalNAcβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GT ₁ †	—	SA2→3Galβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GT ₂ †	—	Galβ1→3GalNAcβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	GQ ₁ †	—	SA2→3Galβ1→4SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer
	FucGg ₁ *	Fucosyl asialo GM ₁	Fucal→2Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
FucGM ₁ †	Fucosyl GM ₁	Fucal→2Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	



Tableau III :

Désignation des Glycosphingolipides utilisés dans le texte et leurs structures

1. La Synthèse bloquée

Les premières investigations faites dans ce domaine ont permis la comparaison de la composition glycolipidique des fibroblastes en culture d'une part et leurs mutants par voie virale d'autre part.

Il en résulte une synthèse incomplète des glycolipides à longue chaîne glycanique [HAKOMORI (45)] due à un blocage d'une ou de plusieurs glycosyltransférases, plutôt qu'à une intensification d'activité des glycosidases.

La composition glycolipidique de leucocytes leucémiques [LEE *et al.* (46)], de carcinomes mammaires [KEENAN *et MORRE* (47)] et de cancers gastro-intestinaux [SIDDIQUI *et al.* (48)] a été étudiée comparativement à celle des cellules et de tissus "normaux". Le résultat indique qu'il y a une synthèse bloquée et l'accumulation de précurseurs structuraux. Ainsi, KEENAN *et MORRE* (47) ont montré que l'accumulation du glycolipide GM 1 dans les carcinomes mammaires est due à un blocage de l'activité "sialyltransférase" convertissant ce monoganglioside en disialoganglioside GD_{1a}.

2. La Synthèse spécifique des cellules transformées

Des glycolipides spécifiques de tumeurs ont souvent été décelés dans de nombreux cancers humains et tumeurs spontanées. La synthèse de ces glycolipides caractéristiques aboutit à la formation de "néo-glycolipides". De nombreuses tumeurs présentent une synthèse bloquée combinée à la néo-synthèse, donnant de ce fait un profil glycolipidique hautement diversifié.

Cette synthèse est le résultat de l'activité de nouvelles glycosyltransférases caractéristiques des cellules tumorales et absentes -ou présentes en quantité infime-, dans les cellules normales correspondantes.

PUKEL *et al.* (49) ont montré que dans certains mélanomes humains, il y a une accumulation du ganglioside GD₃, résultat d'une synthèse bloquée associée à cette synthèse. D'une part, la N-acétylgalactosaminyltransférase est bloquée et le GD₃ n'est pas transformé en GM₂. D'autre part, une activité sialyltransférase intense, décelée dans le sérum des patients présentant les mélanomes, permet la synthèse du GD₃ à partir du GM₃.

Le Tableau IV p.21 reprend les différents travaux sur la synthèse spécifique des cellules transformées induites et spontanées.

CATEGORIES	STRUCTURES	TYPES DE CANCER	REFERENCES
Accumulation de Précurseur - LacCer - GD ₃ - FucCer	Gal (β1-4) Glc (β1-1) Céramide NeuAc (α2-8) NeuAc (α2-3) Gal (β1-4) Glc (β1-1) Céramide Fuc (α1-1) Céramide	Gastro-intestinal Mélanome Colon	HAKOMORI <i>et al.</i> (43) NUDELMAN <i>et al.</i> (50) WATANABE <i>et al.</i> (51)
Néosynthèse - Xglycolipide et polyXglycolipide - Sialosyl Le ^a	Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc (β1-1) Céramide Fuc (α1-3) ↑ Fuc (α1-3) ↑ NeuAc (α2-3) Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal → R Fuc (α1-4) ↑	Colorectal, gastrique, poumon, foie Colorectal, gastrique pancréas	BROCKHAUS <i>et al.</i> (52) MAGNANI <i>et al.</i> (53)

Tableau IV :

Accumulation des précurseurs et/ou synthèse de néo-glycolipides



3. *Passage de la synthèse d'une série à la synthèse d'une autre série*

Chaque type de cellule (ou chaque lignée cellulaire) est défini par une composition caractéristique avec un pourcentage déterminé des différentes séries glycolipidiques : lacto-, globo- et ganglio-séries (Tableau III p.19). Un glissement de la synthèse glycolipidique d'une série vers une autre série peut être observé au cours de la transformation tumorale.

Les myélocytes normaux sont caractérisés par le composant majeur nLc 4 ; en contraste, les cellules myélomonoblastiques caractéristiques de la leucémie contiennent en quantités égales le nLc 4 et le Gb₄. Ce type de transformation est manifestement associé au degré de malignité des cellules [HIRABAYASHI *et al.* (54)].

4. *Changement dans l'organisation glycolipidique des membranes*

Le métabolisme et la structure des glycolipides sont donc modifiés au cours de la transformation oncogénique et il en est de même de l'organisation membranaire. Dans de nombreuses cellules transformées, les glycolipides membranaires deviennent mieux exposés et plus accessibles aux ligands extérieurs. L'exposition des glycolipides dépendant du cycle cellulaire est elle-même altérée dans les cellules transformées comparativement aux cellules non transformées. Les changements structuraux et conformationnels des glycolipides peuvent donc altérer l'immunogénicité des membranes [SJOGREN *et al.* (55)].

B. MODIFICATIONS INTERVENANT DANS LES GLYCOPROTEINES

Récemment, les mêmes changements essentiels trouvés pour les glycolipides (*synthèse spécifique et synthèse incomplète*) ont été détectés dans les glycoprotéines [CHANDRASEKARAN *et al.* (56)]. Toutefois, la modification majeure et commune aux chaînes glycaniques des glycoprotéines des cellules tumorales est l'apparition de glycopeptides de haut poids moléculaire [WARREN *et al.* (57)].

1. Les N-Glycosylprotéines

a. La polyantennarisation

Des glycoprotéines membranaires de cellules tumorales ont été isolées et les glycopeptides partiellement caractérisés. Ceux-ci contiennent des résidus d'oligosaccharides bi-, tri- ou tétra-antennés [OGATA *et al.* (58)].

Une des altérations caractéristiques associées aux cellules transformées et tumorales est une augmentation du nombre de résidus de lactosamine [$\text{Gal} (\beta 1-4) \text{GlcNAc}$] branchés sur le noyau pentasaccharidique [TAKASAKI *et al.* (59) ; MONTREUIL *et al.* (60)].

Cette antennarisation accrue résulte de l'acquisition d'une N-acétylglucosaminyl transférase spécifique permettant le branchement [GLICK *et* SANTER (61)]. Dans une cellule tumorale, le rapport bi/tri antenné est inversé par rapport à la cellule normale. [DELANNOY *et al.* (160)]

b. L'Hypersialylation

WARREN *et al.* (62) ont démontré que l'altération des structures glycaniques des glycoprotéines membranaires représente bien une modification fondamentale primaire associée à la transformation maligne. Par l'utilisation de glycopeptides désialylés, ils ont mis en évidence, dans les cellules transformées, une activité "sialyltransférase" capable de transférer très activement de l'acide N-acétylneuraminique à partir de CMP-NeuAc. Quel que soit le type cellulaire étudié et l'agent transformant, l'hypersialylation des glycoprotéines membranaires est constante. On la retrouve à la fois dans les cellules transformées cultivées *in vitro* ou *in vivo* dans les tumeurs. Il faut signaler que les glycopeptides (préparés à partir des glycoprotéines de noyaux, des mitochondries, des lysosomes ou du réticulum endoplasmique des cellules transformées) présentent tous cette hypersialylation [BUCK *et al.* (63)]. PUCKEL *et al.* (49) ont montré l'existence d'une activité accrue de la sialyltransférase dans les cellules de carcinomes. De même, FUKUDA *et al.* (64) ont mis en évidence une activité sialyltransférase liant les résidus de NeuAc en ($\alpha 2-9$) sur des chaînes polylactosaminiques des lactosaminoglycannes isolés de cellules de carcinome embryonnaire.

c. L'Hyperfucosylation

De nombreux travaux ont montré que les glycopeptides isolés de membranes de cellules tumorales ont un taux de fucosylation supérieur à celui des glycopeptides isolés de cellules normales [WARREN *et al.* (65) ; OGATA *et al.* (58) ; SCANLIN *et al.* (66) SANTER *et al.* (67)]. FUKUDA *et al.* (68) ont montré l'existence de N-acétylglucosamines substituées sur leur carbone C₃ par un résidu de fucose. Cette liaison Fuc ($\alpha 1-3$) GlcNAc est dénommée antigène X (68). Toutefois, ce type de liaison existant dans la structure de diverses glycoprotéines humaines, ne représente pas une altération caractéristique de la cellule tumorale.

2. Les O-Glycosylprotéines

Il est généralement constaté que les glycanes, liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique présentent une densité plus importante et une hypersialylation. La présence sur la partie peptidique de nombreux glycanes O-glycosidiques sialylés protégerait celle-ci de l'action des protéases. Des glycoprotéines de type mucine de haut poids moléculaire ont été mises en évidence dans des cellules de carcinome embryonnaire par HOUNSELL *et FEIZI* (69). L'étude structurale des glycoprotéines membranaires reste difficile car les glycanes sont très hétérogènes. Toutefois, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des structures glycaniques spécifiques en facilite l'identification.

C. CONCLUSION

La Tableau V p.25 résume les différents changements intervenant dans la structure glycanique des glycolipides et des glycoprotéines de cellules tumorales.

III. LES NEO-ANTIGENES DEFINIS PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'accumulation de précurseurs due à une synthèse bloquée ou l'apparition de néoantigènes permet la formation de marqueurs glycaniques, associés aux tumeurs, spécifiques d'un type cellulaire. Les propriétés biochimiques des antigènes associés aux tumeurs ont pu être révélées par l'application de la technique des hybridomes établie par KÖHLER *et MILSTEIN* (79)

A. LES GLYCOLIPIDES *

a. Synthèse incomplète avec ou sans accumulation de précurseur

- Type 1 : Diminution ou suppression de G_{M3} , G_{D3} ; augmentation de LacCer, GlcCer
 Type 2 : Diminution ou suppression de G_{M1} , G_T , G_{D1} ; augmentation de G_{M3} , G_{M2}
 Type 3 : Diminution ou suppression de G_{b4} , G_{b5} ou d'autres glycosphingolipides neutres
 Type 4 : Accumulation du noyau asialo (G_{g4} ; G_{g3} , nLc₄) normalement absent
 Type 5 : Accumulation de G_{D3} ou G_{D2} .

b. Activation d'une nouvelle addition de monosaccharide

- Type 6 : Néosynthèse de G_{B5} (FORSSMAN) et d'autres haptènes Forssman
 Type 7 : Néosynthèse d'antigène de groupe sanguin incompatible, étranger à l'hôte
 ex : Antigène de groupe sanguin A dans des tumeurs gastro-intestinales d'individu de groupe sanguin O ou B
 Type 8 : Elongation d'une chaîne linéaire de type II couplée avec une fucosylation en $\alpha 1 \rightarrow 3$ de chaque résidu GlcNAc
 Type 9 : Synthèse accrue de l'antigène X et de ses dérivés sialylés
 Type 10 : Synthèse accrue de l'antigène Le^a et de ses dérivés sialylés

B. LES GLYCOPROTEINES

a. Augmentation de l'antennarisation et polyglycosylation

b. Densité accrue des chaînes oligosaccharidiques dans les O-glycosylprotéines

c. Changements dans les régions périphériques des glycanes : Hyperfucosylation et hypersialylation

Tableau V :

Types de Glycosylation aberrante dans les cellules tumorales

* Pour les structures et les abréviations des glycolipides, voir Tableau III p. 19

Ainsi, de nombreux antigènes glycolipidiques et glycoprotéiniques ont été détectés soit par une analyse immunologique classique [YANG et HAKOMORI (71)], soit par la technique des anticorps monoclonaux [BREMER *et al.* (72); FALK *et al.* (73); FUKUSHI *et al.* (74, 75, 76); HAKOMORI *et al.* (77); ITO *et al.* (78); NUDELMAN *et al.* (50)].

A. LES NEO-ANTIGENES GLYCOLIPIDIQUES

Depuis que la technique des hybridomes a été introduite dans l'étude immunologique des tumeurs, un grand nombre d'anticorps monoclonaux spécifiques des tumeurs ont été décrits comme définissant des glycolipides. Certains anticorps monoclonaux définissent le précurseur glycolipidique accumulé dans divers types de cancer humain. D'autres sont spécifiques de néoglycolipides qui sont absents des cellules et tissus normaux et qui sont exprimés dans les tissus tumoraux. Deux exemples typiques de néoglycolipides sont le sialyl-Le^a, défini par l'anticorps N-19-9 [FALK *et al.* (73)] et l'antigène poly-X [HAKOMORI *et al.* (77)].

1. Exemple d'un antigène glycolipidique associé au cancer gastro-intestinal

L'anticorps monoclonal N-19-9, produit par des hybridomes obtenus par fusion des lymphocytes avec des cellules d'adénocarcinome du côlon humain, a une affinité apparente pour les tumeurs intestinales humaines [KOPROWSKI *et al.* (79)]. Cet anticorps monoclonal est hautement spécifique non seulement des colorectoadénocarcinomes mais également des cancers gastriques et pancréatiques. L'agglutination de l'anticorps avec des extraits de tissus cancéreux est inhibé par le sérum de patients ayant des adénocarcinomes du côlon mais n'est pas inhibé par le sérum de patients sains [KOPROWSKI *et al.* (80)].

L'antigène spécifique de cet anticorps monoclonal a été isolé de la fraction gangliosidique de tumeur et de méconium. Il a été identifié comme le monosialoganglioside et sa structure (Fig.7 p.28) a été déterminée par MAGNANI *et al.* (81). Les chaînes glycaniques sialylées de type I sont spécifiques des tumeurs. Cet antigène a également été détecté dans la structure d'une glycoprotéine sérique de type mucine. L'antigène est détecté en plus grande quantité dans les mucines d'individus de groupe sanguin Le (a-b+). Ceci est probablement dû à une compétition, pour le même accepteur oligosaccharidique, entre la glycosyltransférase produisant la structure Le^b et celle produisant la structure sialyl Le^a.

2. Exemple d'anticorps monoclonaux dirigés contre la séquence X (Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]GlcNAc)

Un anticorps monoclonal (WGHS 29-1) résultant d'une hybridation avec des cellules de cancer gastrique et trois anticorps monoclonaux (ZWG 13, ZWG 14, ZWG 111), résultant de la fusion avec des cellules d'adénocarcinome du côlon reconnaissent spécifiquement la structure X (Fig. 8, p.28) [BROCKHAUS *et al.* (52)].

3. Discussion

Aucun de ces antigènes n'est un produit spécifique d'une tumeur donnée. Certains sont présents dans les cellules de tissus normaux desquels dérivent les tumeurs. Les antigènes dans les cellules normales sont souvent cryptiques et immunologiquement non détectables. L'apparition de ces antigènes pourraient être due à l'activation de fucosyl- ou sialyltransférase aberrante et peut être considérée comme le résultat d'une synthèse spécifique des cellules transformées.

L'expression des antigènes glycolipidiques à la surface cellulaire n'est pas seulement contrôlée par l'équilibre synthèse-dégradation mais est influencée par leur organisation à la surface cellulaire [URDAL *et* HAKOMORI (82)], à savoir :

- l'état d'accumulation qui dépend de la concentration en antigènes,
- l'état de coexistence des glycolipides et des protéines qui peuvent masquer les antigènes,
- la composition en céramide qui détermine la stabilité stérique et l'orientation de l'antigène.

B. LES NEO-ANTIGENES GLYCOPROTEINIQUES

Les néo-antigènes glycoprotéiniques sont également des antigènes associés aux tumeurs et certains sont reconnus par des anticorps monoclonaux (VEP 8, VEP 9, F.C. 10.2 par exemple). Ces structures glycaniques reconnues par les anticorps monoclonaux appartiennent à la région variable du glycanne et, parfois, une glycosylation supplémentaire de cette partie transforme ces néo-antigènes en antigènes nouveaux, définissant les groupes sanguins majeurs A, B, H, Lewis^a et Lewis^b.

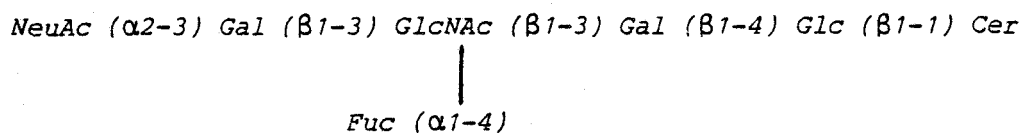


Fig. 7 :

Structure du sialyl Le^a défini par l'anticorps monoclonal N-19-9

[MAGNANI, 1982]

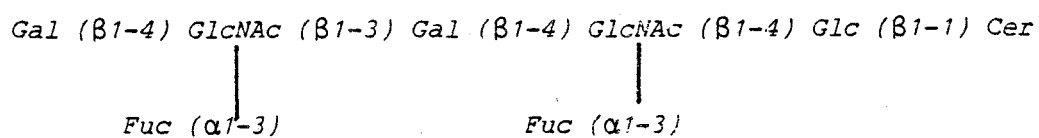
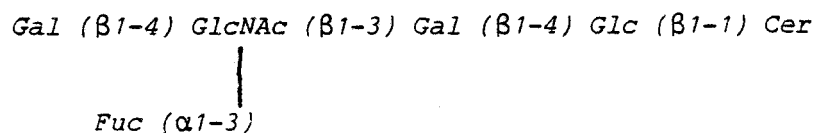


Fig. 8 :

Structure des fucolipides définis par des anticorps spécifiques

Ainsi, les deux anticorps monoclonaux VEP 8 et VEP 9 reconnaissent un marqueur distinctif des cellules de myelome [GOOI *et al.* (83)]. Cependant, le déterminant reconnu par ces anticorps (Fig. 9a, p.31) devient masqué par la présence du fucose de l'antigène de groupe sanguin H [GOOI *et al.* (84)]. La structure difucosylée ainsi formée (Fig. 9b, p.31) est spécifiquement reconnue par l'anticorps monoclonal C 14/1/46/10 dirigé contre un antigène de l'épithélium du côlon [BROWN *et al.* (85)].

Dans la recherche de nouveaux marqueurs du cancer du côlon, de nombreux groupes ont isolé, de carcinomes colorectaux, des antigènes associés aux cancers. Des molécules, tels l'antigène du cancer gastro-intestinal (G.I.C.A.) [KOPROWSKI *et al.* (79)], l'antigène embryonnaire (S.S.E.A.) [SOLTER *et* KNOWLES (86)] et l'antigène sialyl-Lewis^X (CSLEX 1) [FUKUSHIMA *et al.* (87)] ont une expression accrue dans les tissus cancéreux du côlon et du rectum. Ces antigènes sont toutefois en relation avec les antigènes de groupes sanguins Lewis et i et diffèrent seulement dans la glycosylation de la séquence variable du glycanne [BLEDAY *et al.* (88)].

L'application de ces anticorps monoclonaux, (caractérisant des glycanes spécifiques de la surface cellulaire), au diagnostic et au traitement des cancers humains est prometteuse mais des études plus approfondies sont encore nécessaires.

IV. PROPRIETES DES NEO-ANTIGENES MARQUEURS DES CELLULES TUMORALES

Il a été montré qu'un grand nombre de ces marqueurs cellulaires reconnus par des anticorps monoclonaux sont des structures glycaniques. Les marqueurs antigéniques en question sont aussi divers que a) l'antigène de régulation du développement des érythrocytes humains [MARSH (89)], b) l'antigène marqueur des adénocarcinomes gastriques des sujets sécréteurs d'antigènes de groupes sanguins [PICARD *et al.* (90)], c) le marqueur d'adénocarcinomes du côlon humain [BROWN *et al.* (85)], le marqueur antigénique de l'endoderme foetal [WILLIAMS *et al.* (91)], e) les marqueurs distincts des granulocytes humains parmi les cellules sanguines [RUMPOLD *et al.* (92)], f) les antigènes de la différenciation de l'épithélium du poumon [FORSTER *et al.* (93)]. Tous ces marqueurs antigéniques sont des structures glycaniques de glycoprotéines et de glycolipides de la surface cellulaire. Ils appartiennent à la famille des structures glycaniques qui inclut également les antigènes des groupes sanguins A, B, H, Le^a, Le^b.

A. EXEMPLES DE DETERMINANTS GLYCANNIQUES PORTES PAR LES GLYCOLIPIDES ET LES GLYCOPROTEINES

De nombreux déterminants associés aux tumeurs, appartenant à la série "lacto-" (Fig. 10, p. 31), peuvent être portés par les glycolipides et les glycoprotéines. Ceci est le cas pour l'haptène X, l'haptène Y, le sialyl Le^a et le sialyl X. Ces déterminants se trouvent accumulés dans des tumeurs diverses et sont caractérisés par leurs anticorps respectifs. Ainsi, la structure hapténique X est identifiée chimiquement dans des tumeurs de neuroblastomes humains [SANTER *et al.* (94)] et dans les antigènes carcino-embryonnaires [CHANDRASEKARAN *et al.* (56)].

Toutefois, la proportion exacte d'antigènes glycolipidiques par rapport aux antigènes glycoprotéiniques n'est pas déterminée pour beaucoup de tumeurs. Ceci est dû à des difficultés techniques.

L'anticorps monoclonal FC 10.2, qui a une spécificité pour les tissus de l'endoderme foetal reconnaît aussi une structure exprimée dans les glycoprotéines et les glycolipides [GOOI *et al.* (84)]. Le déterminant appartient à la séquence glycannique de type I montrée Fig. 10, p. 31. Cette séquence est connue pour appartenir aux tissus gastro-intestinaux adultes. Toutefois, l'association avec l'anticorps monoclonal est abolie en cas de glycosylation additionnelle.

Un glycolipide contenant le lacto-N-fucopentaose III a été isolé d'adénocarcinomes humains [YANG *et HAKOMORI* (95)]. La même séquence oligosaccharidique est présente dans les glycoprotéines [LLYOD *et al.* (96)]. L'anticorps dirigé contre cette séquence détecte un antigène appelé My-1, qui est exprimé intensément dans les granulocytes humains ainsi que dans les cellules précurseurs des granulocytes mais qui ne l'est pas dans les lymphocytes, les monocytes et les érythrocytes.

Il est intéressant de constater que certains néo-antigènes -et particulièrement les déterminants fucosylés et sialylés (sialyl Le^a et sialyl X) - sont non seulement présents dans les tissus tumoraux mais sont également libérés dans le sang circulant. Ainsi, le taux de ces antigènes dans le sang peut devenir un critère utile pour le diagnostic des cancers humains [IGURO *et al.* (97)].

Le sialyl Le^a, antigène majeur dans le plasma, a été identifié comme étant porté par une glycoprotéine de type mucine plutôt que par un glycolipide.

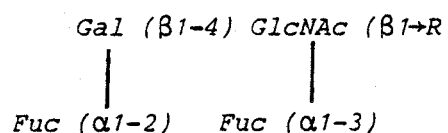
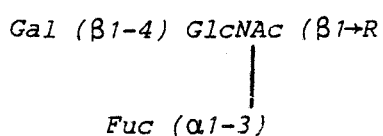
a : VEP 8, VEP 9b : C 14/1/46/10

Fig. 9 :

Structures antigéniques reconnues par les anticorps monoclonaux

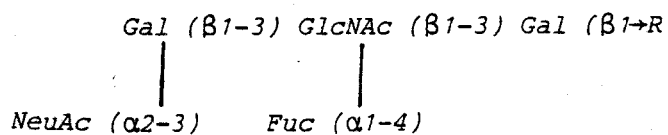
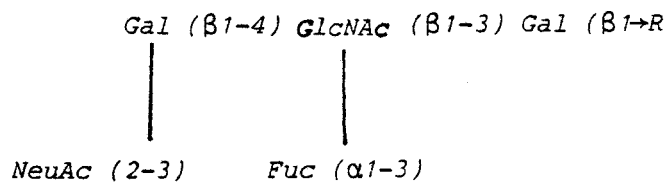
a) Lacto-série de type I :
sialyl Le^ab. Lacto-série de Type II :
sialyl Le^x

Fig. 10 :

Marqueurs associés aux tumeurs gastro-intestinales de la série "Lacto"



B. LES NEO-ANTIGENES MARQUEURS EXPRIMES SPECIFIQUEMENT DANS LES GLYCOLIPIDES

La synthèse bloquée des glycolipides dans les tumeurs provoque souvent l'accumulation de précurseurs et la synthèse spécifique résulte en l'apparition de nouveaux glycolipides. Chacun de ces mécanismes induit une accumulation de glycolipides, caractéristiques des cellules tumorales et qui sont absents ou présents en quantité infime, dans les cellules non transformées. Les structures appartenant aux séries globo et lacto (Tableau III, p.19) sont uniquement exprimées dans les glycolipides. Ainsi, l'antigène GD₃ de mélanomes humains [NUDELMAN *et al.* (50), PUKEL *et al.* (49)], l'antigène Gb₃ du lymphome de Burkitt [NUDELMAN *et al.* (981)] et l'antigène Gg₃ du lymphome de Hodgkin [KNIEPP *et al.* (99)] ne se retrouvent pas dans les glycoprotéines.

Les marqueurs glycolipidiques sont très immunogènes et sont portés par divers types de tumeurs malignes. Ils sont par conséquent distincts des antigènes associés aux tumeurs classiques et le terme de "marqueurs de tumeur" est plus approprié. Leur présence est décelée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. De plus, des changements dans l'organisation membranaire peuvent favoriser l'exposition de glycolipides de type spécifique à la surface cellulaire et contribuer ainsi à l'expression de marqueurs de tumeurs. Le mécanisme exact contrôlant la crypticité des glycolipides est inconnue mais la co-existence de glycolipides à longues chaînes et de glycoprotéines peut masquer les chaînes glycolipidiques marqueurs de tumeurs.

Les facteurs affectant l'expression glycolipidique sont résumés dans le schéma de la Fig. 11, p.33.

C. L'ANTIGENE X : Gal (β1-4) [Fuc (α1-3)] GlcNAc ET SES DERIVES, MARQUEURS DE CELLULES TUMORALES

Le déterminant Lewis^X peut être exprimé dans les glycoprotéines et les glycolipides. L'haptène X (Fig. 12, p.35) est également dénommé Lewis^X [HAKOMORI *et al.* (100)], SSEA-1 [SOLTER *et* KNOWLES (86)], My-1 [CIVIN *et al.* (101)].

Le dérivé sialylé de l'haptène X ou sialyl Lewis^X (Fig. 12, p.35) a été détecté dans une structure glycolipidique de cellule rénale. Cette même forme sialylée a été décelée dans des glycoprotéines stomacales de type mucine.

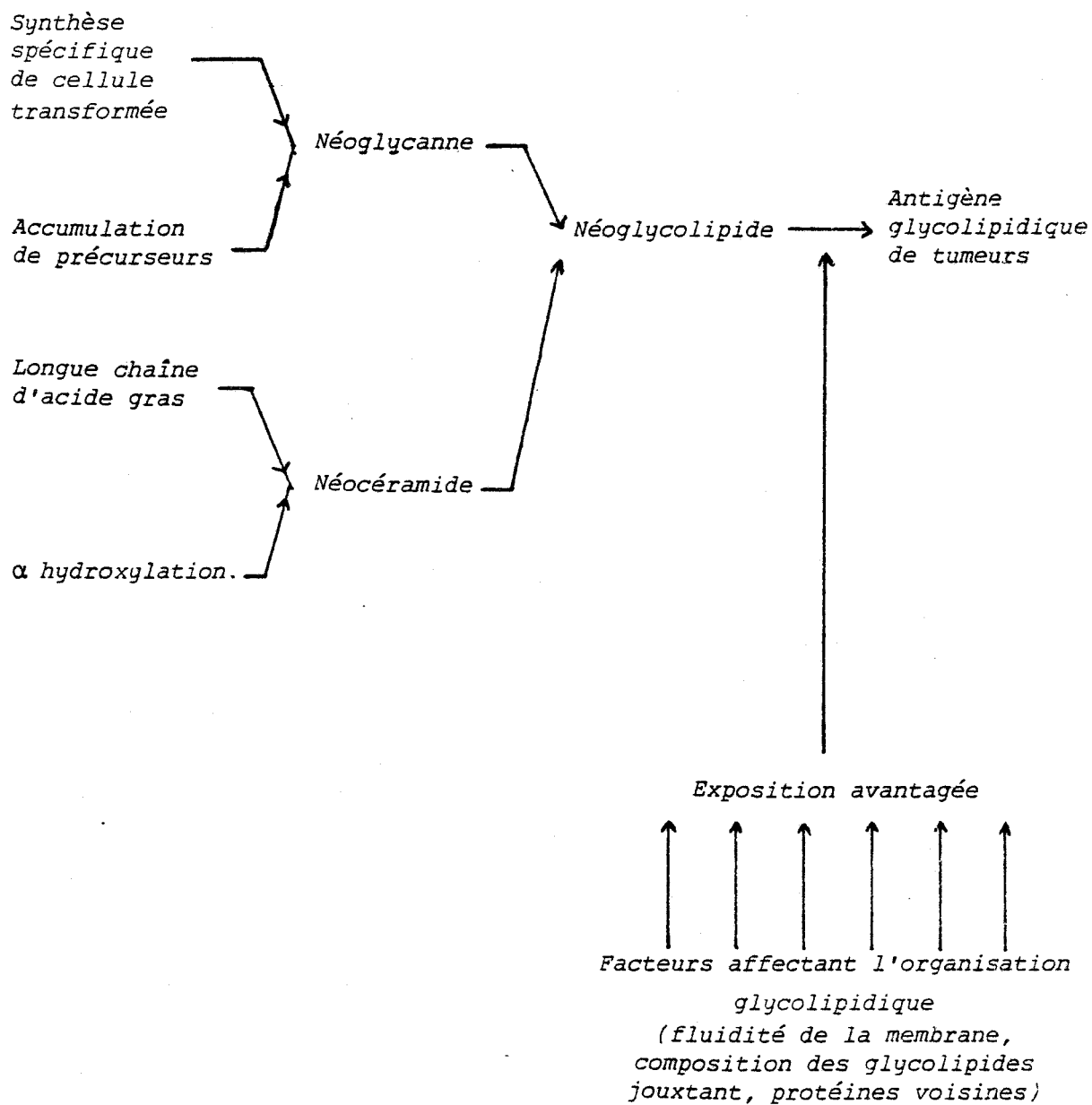


Fig. 11 :

Mécanisme de l'expression des antigènes glycolipidiques associés aux tumeurs

1. L'Haptène X déterminé dans les glycolipides

Des anticorps monoclonaux, dirigés contre des cellules pulmonaires cancéreuses, ont été identifiés comme spécifiques de la structure hapténique X. Ces anticorps monoclonaux réagissent tous avec une série de glycolipides accumulés dans différents tissus cancérisés du poumon. Le glycolipide majeur réagissant avec ces anticorps a, en chromatographie couche mince, la même mobilité que le lactofucopentaose III Céramide [HUANG *et al.* (102)].

Ce dernier composé a été découvert accumulé dans de nombreux cas (si ce n'est dans tous) d'adénocarcinomes [YANG *et al.* (71)]. De nombreux glycolipides de tumeurs du poumon, ayant une mobilité faible en couche mince, incluent des dérivés di-ou trifucosylés. Récemment, une étude systématique des glycolipides à haptène X a été entreprise dans les tissus normaux et tumoraux [MAGNANI *et al.* (103), HIROTA *et al.* (104)]. La présence de glycolipides polylactosaminiques di- ou trifucosylés accumulés dans une grande variété d'adénocarcinomes humains est particulièrement notable. Six structures avec le déterminant X ont été identifiées. Des glycolipides ayant une structure commune (Fig. 13, p. 35, formule A et B) sont accumulés en grande quantité dans de nombreux cas d'adénocarcinomes humains incluant les cancers gastriques, du côlon, du foie et du poumon. D'autre part, des glycolipides avec le déterminant X à l'extrémité terminale non réductrice d'une chaîne de type II (formule C, Fig. 13, p. 35) sont présents dans les tissus normaux et ne sont pas spécifiques de tumeurs. L'augmentation d'une activité fucosyltransférase peut expliquer la synthèse des résidus fucosylés (I) et (II) des formules A et B dans les adénocarcinomes humains (Fig. 13, p. 35) puisque la disparition des marqueurs antigéniques correspond à la perte de cette même activité. Au contraire, la fucosyltransférase responsable de la synthèse du résidu fucosylé (III) ne voit pas son activité affectée par la cancérisation. C'est pourquoi de nombreux groupes cherchent à sélectionner des anticorps monoclonaux à spécificité unique liée à la position du déterminant antigénique afin d'obtenir des marqueurs spécifiques de tumeur [HIROTA *et al.* (105), (104); MURAMATSU *et al.* (106); OLDING *et al.* (107)].

2. L'Haptène X dans les Glycoprotéines

Le déterminant antigénique X a été décelé par LLOYD *et al.* (96) dans des oligosaccharides du plasma sérial. Ceux-ci ont été définis par VAN HALBECK *et al.* (108) comme étant des résidus mineurs de glycannes de glycoprotéines circulantes.

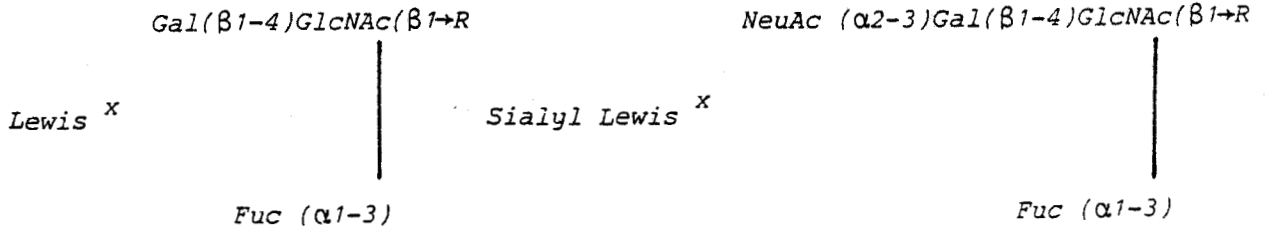


Fig. 12 :

Structures de l'haptène X et de son dérivé sialylé

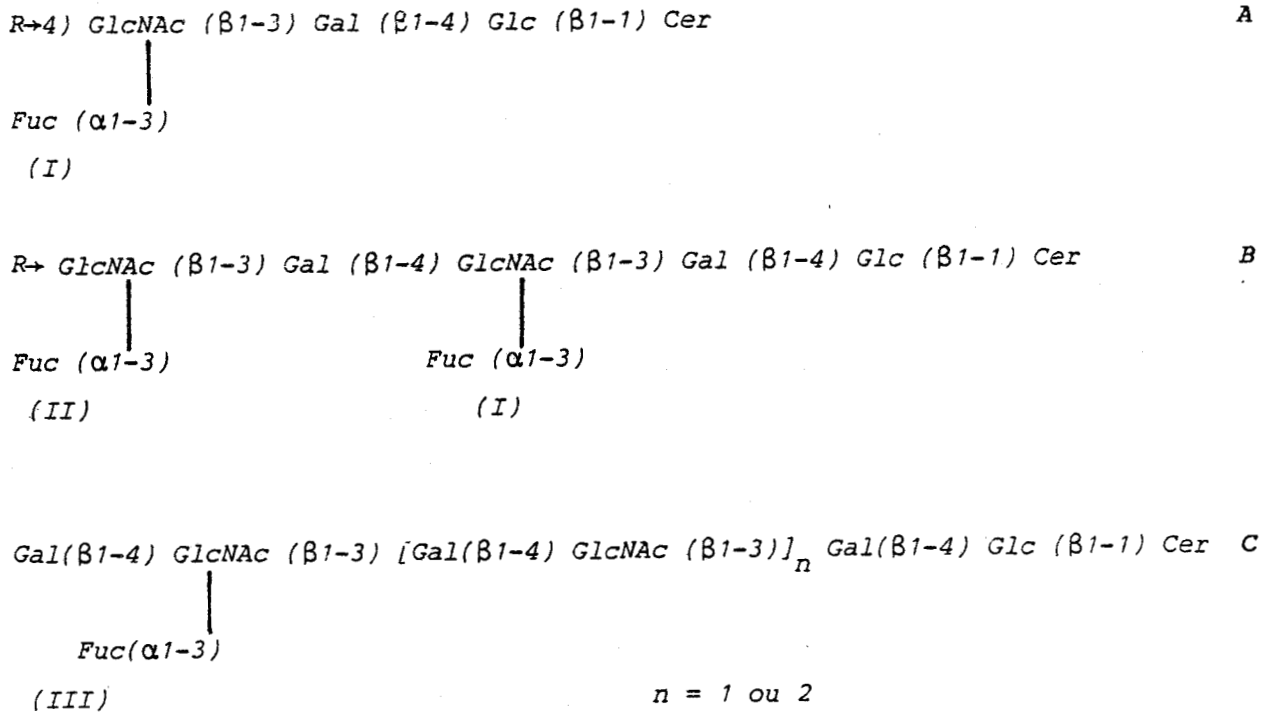


Fig. 13 :

Structure des différents glycolipides polylactosaminiques fucosylés rencontrés dans les tissus humains

Dans les tissus normaux adultes, des glycanes avec le déterminant sialyl X ont été caractérisés comme des composants structuraux de N-glycosylprotéines.

Dans le plasma séminal humain et dans le liquide amniotique, l'antigène sialyl X est exprimé avec l'isomère sialyl Lewis ^a [HANNISH *et al.* (109)]. Ces auteurs ont isolé des mucines amniotiques un déterminant antigénique sialyl X associé aux tumeurs (Fig. 14, p.37). Bien que la plupart des anticorps monoclonaux définissent essentiellement des antigènes de nature glycolipidique, il ne faut pas négliger l'importance des mucines qui présentent également des structures antigéniques utiles au diagnostic. Toutefois, la détection immuno-chimique et la caractérisation d'épitopes glycaniques aberrants, dans les mucines de sérum normal, suscitent deux questions. (i) Existe-t-il réellement des différences structurales d'une part, entre les oligosaccharides de type mucine, qui ne sont pas facilement détectables par des anticorps monoclonaux et les épitopes glycolipidiques d'autre part ? (ii) Dans les cellules tumorales et dans le sérum de patients sains, sont-ce les mêmes glycosyl-transférases qui induisent la biosynthèse des structures glycaniques aberrantes ?

FUKUDA *et al.* (110) ont montré que le lactosaminoglycane sialylé des granulocytes humains contient une quantité importante de sialyl Lewis ^x. Les structures proposées pour les lactosaminoglycannes fucosylés et sialylés sont reprises à la p. 37 Fig. 15. L'isomère structural du sialyl Lewis ^x est le sialyl Lewis ^a qui a été décrit dans des cellules de tumeurs gastro-intestinales et dans certaines cellules normales [MAGNANI *et al.* (81)]. Cette structure est toutefois absente des cellules gastro-intestinales normales. PRIEELS *et al.* (111) ont montré qu'une fucosyltransférase purifiée du lait humain transfère le fucose à la fois sur les structures Gal (β1-3) GlcNAc (type I) et sur Gal (β1-4) GlcNAc (type II). Ceci aboutit à la formation des structures Lewis ^a et Lewis ^x, respectivement. En revanche, SHEARES *et* CARLSON (112) montrent que les structures Gal (β1-3) GlcNAc et Gal (β1-4) GlcNAc sont formées par différentes galactosyltransférases. Ainsi, la formation des structures antigéniques Lewis ^a et Lewis ^x dépend de la structure de la partie terminale synthétisée par des galactosyltransférases spécifiques. De même, une α2-3 sialyltransférase purifiée du foie de rat transfère l'acide sialique indifféremment sur Gal (β1-3) GlcNAc et Gal (β1-4) GlcNAc. [WEINSTEIN *et al.* (113)]. Toutefois, l'α1-3/4 fucosyltransférase mentionnée ne peut pas transférer de fucose sur le trisaccharide NeuAc (α2-3) Gal (β1-3/4) GlcNAc [PRIEELS *et al.* (111)], pas plus que l'α2-3 sialyltransférase ne peut transférer d'acide sialique sur Gal (β1-3/4)[Fuc (α1-3)] GlcNAc [WEINSTEIN *et al.* (113)].

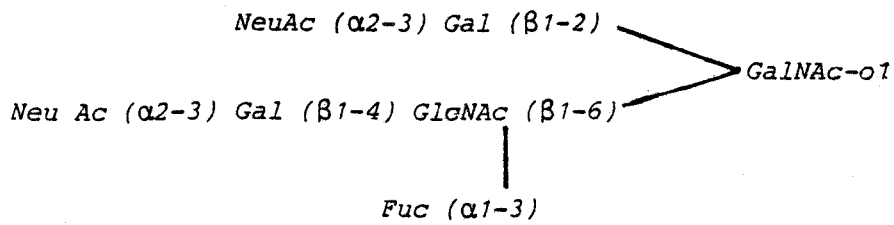


Fig. 14 :

Structure primaire du di-sialylpentasaccharide isolé des mucines amniotiques
 [HANNISCH, 1986]

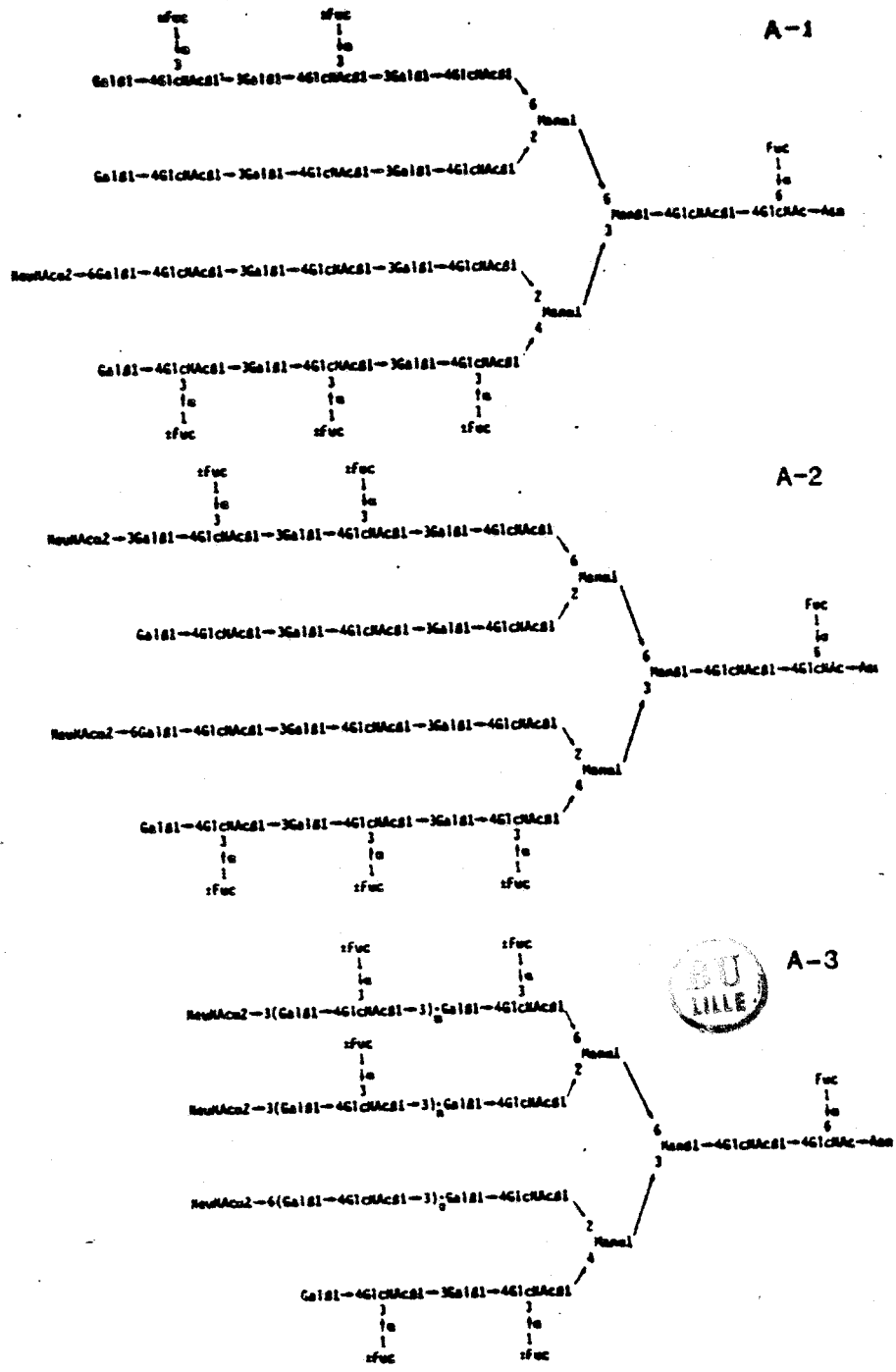


Fig. 15 :

Structures proposées pour le lactosaminoglycane fucosylé et sialylé
 [FUKUDA, 1984]

Au vu des structures proposées, on peut émettre l'hypothèse que les granulocytes humains, les tumeurs gastro-intestinales et les tissus foetaux semblent posséder une fucosyltransférase ou une sialyltransférase à spécificité plus large que les transférases purifiées. Des études sont actuellement menées pour savoir quelle est la transférase, dans ces tissus, qui a la spécificité requise.

3. Conclusion

L'antigène X est surtout présent sous sa forme sialylée.

L'augmentation des résidus d'acide sialique dans les structures membranaires des cellules circulantes et de cellules de tissus cancéreux protège la surface cellulaire de l'action protéolytique. L'acide sialique atténue l'immunogénicité par le masquage des glycanes, joue un rôle dans l'adhésion, sert de récepteur, tend à augmenter la solubilité et apparaît en corrélation avec l'aptitude à la métastase.

La présence de l'antigène X en grande quantité dans les glycoprotéines de cellules tumorales conduit à penser qu'il s'agit d'un vestige d'une différenciation avec une réexpression durant l'oncogénèse [SANTER *et al.* (94)].

D. CONCLUSION GENERALE SUR LES MARQUEURS GLYCANNIQUES DES TUMEURS

Les saccharides de la surface cellulaire sont des antigènes importants associés aux tumeurs. Cependant, aucun des antigènes caractérisés n'est spécifique d'une tumeur ou d'un type de cellules donné. Les changements observés dans les structures glycaniques sont dus à des changements dans la disponibilité des substrats donneurs, dans l'activité des glycosyltransférases ou dans les gènes qui codent pour la biosynthèse de ces enzymes. La relation entre ces changements et le processus néoplasique reste toutefois floue. REAL *et al.* (114) ont tenté d'établir une classification pour les antigènes de la surface cellulaire. Cette classification est le résultat d'une étude sur des patients atteints de mélanomes, de cancer rénal et de leucémie aigüe. Les antigènes de tumeurs se répartissent comme suit :

- la classe 1 réunit les antigènes, à restriction absolue pour un type de tumeurs jamais détectés dans des cellules normales ou dans un autre type de cellules malignes,
- la classe 2 comprend les antigènes rencontrés dans des types voisins de tumeurs et en quantité infime dans les cellules normales,
- les antigènes de la classe 3 ont une distribution large dans les cellules normales et malignes.

V. LES NEO - ANTIGENES ONCOFOETAUX

Il a été montré que de nombreux constituants cellulaires normalement présents durant la vie embryonnaire peuvent également être présents durant les vies foetales et néo-natales. Ces mêmes constituants cellulaires existent à faible concentration dans les tissus adultes. Ces faits, ainsi que la ressemblance marquée entre les cellules immatures et cancéreuses à d'autres niveaux de l'activité biologique et dans les structures, ont conduit à la conclusion que les tumeurs malignes spontanées et induites sont dues à des différenciations incomplètes ou à une rétro-différenciation.

Depuis la découverte de l'antigène carcinoembryonnaire (C.E.A.) [ABELEV *et al.* (115)] et de l'antigène oncofoetal spécifique du cancer du pancréas (P.O.A.) [BANWO *et al.* (116)], les antigènes oncofoetaux ont joué un rôle primordial dans l'étude du développement du cancer. Ces antigènes foetaux normaux, anormalement exprimés par la cellule néoplasique, sont devenus des marqueurs utilisés en thérapie et en diagnostic du cancer [SHIMANO *et al.* (117) ; SZKUDLAREK *et al.* (118) ; DIETERT *et al.* (119) ; BENEDI *et al.* (120)].

Essentiellement, les chaînes glycaniques des glycoprotéines et des glycolipides subissent des changements rapides, irréversibles et drastiques durant le développement et la différenciation. Des exemples bien définis sont (a) l'altération de la structure branchée des chaînes glycaniques de la série lacto, identifiée à une interconversion I/i dans la différenciation des cellules érythroleucémiques [KANNAGI *et al.* (121)], (b) la modification des chaînes de type II responsable de l'apparition de l'haptène X [GOOI *et al.* (83)], (c) la transition de l'expression antigénique des séries globo vers les antigènes P^k, P et FORSSMAN [WILLISON *et al.* (122)]. Un conjugué multimérique Lacto-N-fucopentaose-III-lyssyllysine inhibe irréversiblement la compacité de la "morula", prouvant que la structure hapténique X est essentielle dans la reconnaissance cellule-cellule, au stade embryonnaire morula, pour des différenciations subséquentes.

A. EXPRESSION ANACHRONIQUE DES GLYCOLIPIDES DANS LES TUMEURS

Divers types de changements glycolipidiques dans les cancers humains peuvent corrélés avec l'expression anachronique de ces glycolipides due à un gel des programmes de différenciation et de développement. Actuellement, les expérimentations pouvant supporter cette idée sont fragmentaires.

Toutefois, les commentaires suivants, se rapportant à la Fig. 16, p.41 peuvent expliquer l'expression d'une grande variété de glycolipides dans les cellules tumorales. Les glycannes des glycolipides, comme ceux des glycoprotéines, sont exprimés à des étapes spécifiques de l'ontogénèse et ils disparaissent, réapparaissent à nouveau ou sont continuellement absents durant le développement. Quand les cellules sont transformées par un oncogène et que des tumeurs se forment, de nombreuses chaînes glycaniques des cellules tumorales voient une rétrogression de leurs structures. L'intensité de cette expression est montrée par la densité des tâches (Fig. 16, p. 41).

La structure X voit son expression maximale à l'étape blastocyte et, aux étapes suivantes, pour décliner lors du développement et être exprimé à nouveau dans différents organes. Mais, cette structure X n'existe pas dans les tissus adultes (A). Un tel exemple est appliqué au SSEA-1. Les structures des séries globo, incluant l'antigène Forssman, peuvent être exprimées aux premières étapes de l'embryogénèse puis déclinent et sont limitées à divers tissus et organes (B). Les antigènes disparaissent durant la morphogénèse et apparaissent à nouveau lorsque le développement est complet (C). Le sialyl Le^a ou les structures poly-X sont essentiellement absents dans les tissus adultes mais sont présents à certains stades chez l'embryon (D).

Ainsi, chaque structure spécifique a son propre historique avec une expression caractéristique maximale à une certaine étape de l'ontogénèse. Dans chaque clone de cellules transformées, le profil des glycannes est le même que celui trouvé chez l'embryon à une étape donnée. Par exemple, l'expression de A est accrue dans la tumeur A (T_A) puisque la rétrogénèse sévissant, correspond à une étape où l'expression de A était maximale (voie A). La chaîne glycanique B dans la tumeur T_B pourrait être présente en grande quantité, puisque la rétrogénèse correspond à un stade embryonnaire où B est exprimée (voie B). Alternativement, son expression peut être supprimée si la rétrogénèse correspond à une étape "blanche" de l'ontogénèse (voie b'). Dans l'exemple D, le sialyl Le^b ou les structures poly-X, généralement absents des tissus adultes, sont présents dans les tumeurs T_D car la rétrogénèse correspond à un stade de développement où ces structures existent (voie d). L'expression des glycannes dans diverses tumeurs peut être expliquée par ce schéma hypothétique [HAKOMORI et KANNAGI (123)].

La disparition ou la réapparition de chaînes glycaniques spécifiques peut être basée essentiellement sur une répression épigénétique ou sur une dérégulation d'un gène régulateur. Donc la glycosylation aberrante de cellules cancéreuses, est une conséquence de déficits génétiques. Tout ceci reste hypothétique.

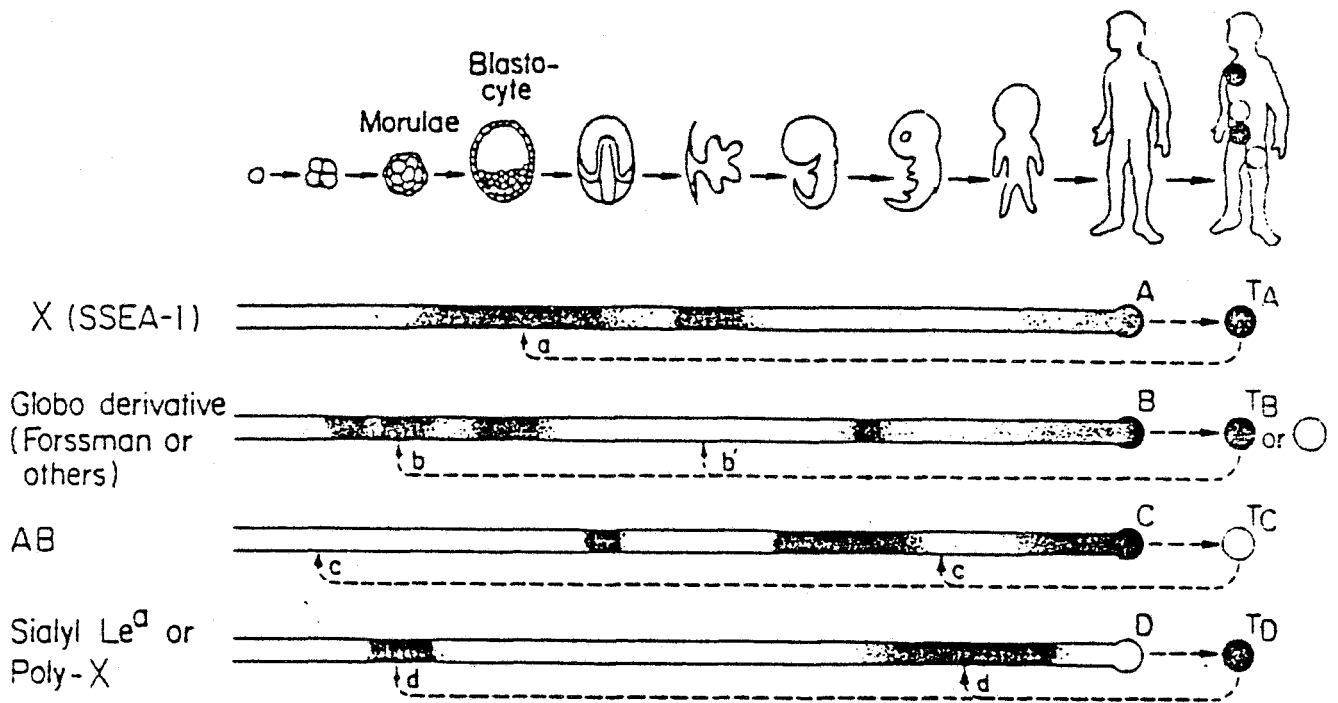


Fig. 16 :

Schéma hypothétique de l'expression glycanique dépendante du stade embryonnaire et de l'expression rétrogénétique de ces structures dans les tumeurs

[HAKOMORI et KANNAGI, 1983]



● Antigène exprimé

○ Antigène non exprimé

Une technique analytique sur de très petites quantités de tissu foetal ne peut être une preuve irréfutable. Néanmoins, les anticorps monoclonaux qui caractérisent des structures glycaniques spécifiques, permettent l'étude de la glycosylation spécifique de tissus aux différents stades du développement. Une étude immunohistologique sur la distribution des antigènes mono- et di-fucosylés, définis par les anticorps monoclonaux FH3 et FH4, dans les tissus foetaux, confirme cette idée (Fig. 17, p.43). L'antigène X et ses formes di- ou trimériques ne sont pas exprimés dans l'embryon humain en phase de pré-implantation comme le suggèrent l'absence de l'antigène X dans les tératocarcinomes indifférenciés et l'induction de la synthèse d'antigènes lors de la différenciation. Ces antigènes sont, en revanche, exprimés dans divers tissus de l'embryon après l'implantation. L'expression de l'antigène FH4 dans l'épithélium du côlon est maximale entre la 7ème et la 9ème semaine puis régresse presque complètement, pendant que l'antigène FH3, ne régresse pas et persiste dans les cellules cryptiques. L'antigène FH4 est exprimé dans les cancers gastriques différenciés, laissant supposer que la rétrogénèse se produit à un point où l'expression FH4 est à son maximum (*flèche 2*). Cependant, l'expression antigénique FH4 est nulle dans le cancer gastrique indifférencié et peut correspondre à un stade primaire de l'embryogénèse pendant lequel FH4 n'est pas exprimé (*flèche 1*). Ces travaux sont dus à FUKUSHI *et al.* (124).

De nombreux travaux, portant sur une grande variété de cancers humains, ont permis de déceler la présence de structures rencontrées jusqu'alors uniquement dans les cellules foetales ou dans le méconium. [MAGNANI *et al.* (81) ; FUKUSHIMA *et al.* (87) ; SHI *et al.* (125) ; BRODIN *et al.* (126) ; FUKUDA *et al.* (68) ; HOLMES *et al.* (127)]. Ces différentes structures glycaniques constituent des marqueurs onco-foetaux des tumeurs.

B. LES ANTIGENES GLYCANNIQUES ASSOCIÉS A LA DIFFÉRENCIATION

Il est intéressant de détecter et d'identifier les différentes molécules qui apparaissent lors des différentes étapes du développement foetal, de la différenciation cellulaire ou de la maturation. Il est présumé que chaque changement dans les molécules est impliqué et joue un rôle important dans le processus de différenciation. Il existe un système de différenciation des antigènes glycaniques basé sur les structures de type I ou de type II et leurs monosaccharides périphériques [FEIZI (128)].

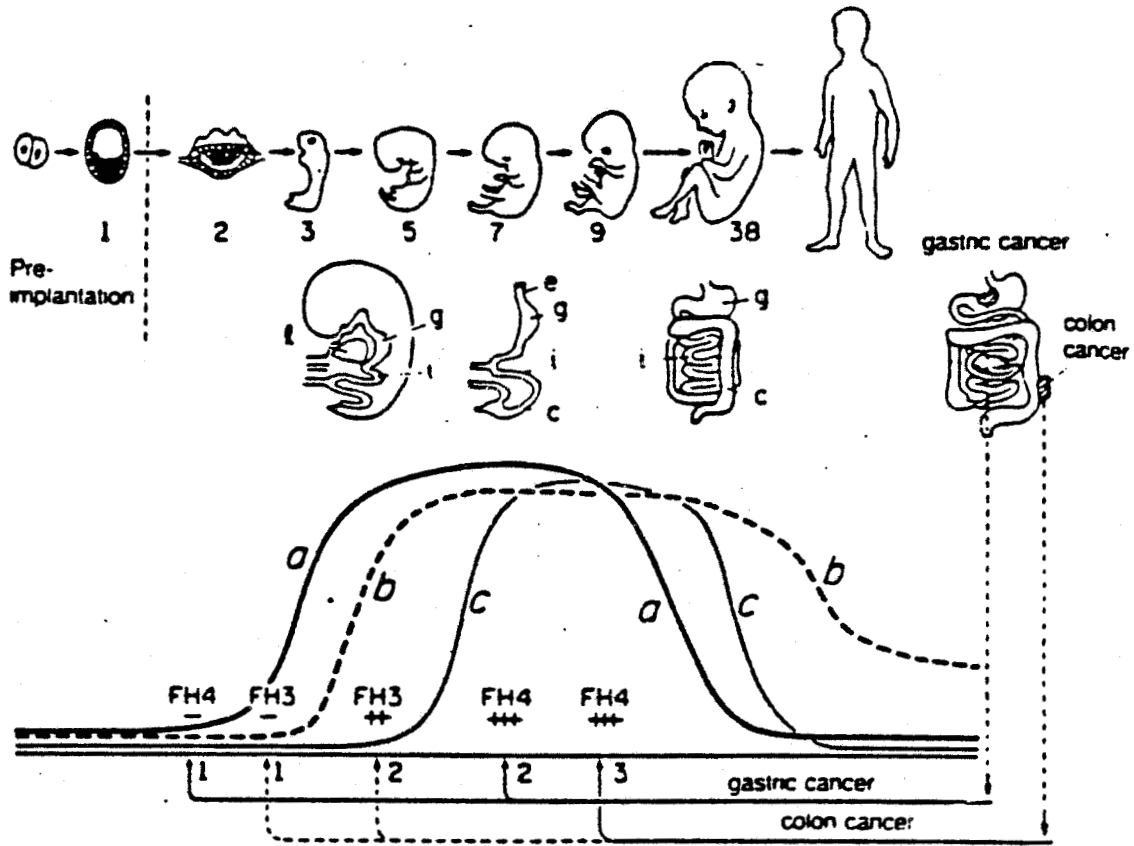


Fig. 17 :

Expressions de l'Antigène X (défini par FH_3)
 et de ses formes di- ou trimériques (définies par FH_4)
 dans l'Epithélium gastro-intestinal durant le développement
 humain

[FUKUSHI, 1984]

- Courbes a et c illustrent les changements de l'expression antigénique FH_4 dans l'épithélium gastrique et du côlon
- Courbe b représente les changements de l'expression antigénique FH_3 dans l'épithélium du côlon
- Les chiffres correspondent au nombre de semaines depuis la fécondation

1. Les Antigènes basés sur la structure de Type II

L'antigène i est un marqueur des érythrocytes du foetus humain et est remplacé après un an par l'antigène I. Les antigènes i, I sont exprimés dans une séquence glycanique appelée type II, formée d'unités répétitives de N-acétyllactosamine [$Gal (\beta 1-4) GlcNAc$]. Ils sont présents dans une grande variété de types cellulaires. Dans les érythrocytes, ils sont portés par des protéines, connues sous le nom de bandes 3 et 4,5 et par des polyglycosylcéramides et des glycolipides. Les antigènes I, i peuvent être dans un état antigéniquement actif ou dans un état cryptique s'ils sont périphériquement glycosylés et masqués par des monosaccharides formant les antigènes de groupes sanguins majeurs A, B, H. L'antigène i est exprimé dans des séquences linéaires formées d'au moins trois unités N-acétyllactosaminiques (Tableau VI, p. 45) alors que l'antigène I est exprimé sur les structures branchées poly-N-acétyllactosaminiques.

Les anticorps monoclonaux anti-I du sérum de patients Ma et Step (*anti-I(Ma)*, *anti-I (Step)*) reconnaissent différents domaines de la structure branchée de l'antigène I (Tableau VI, p.45). Ces anticorps monoclonaux ont révélé des types cellulaires et des différences spécifiques dans la courbe d'expression des antigènes I et i. Par exemple, bien que l'antigène i s'exprime de façon prédominante dans les érythrocytes foetaux plutôt qu'adultes, il est exprimé simultanément avec l'antigène I dans des lymphocytes B d'adultes. Par ailleurs, bien que le déterminant I(Ma) soit un composant normal des érythrocytes adultes, il apparaît comme un antigène associé aux tumeurs dans les carcinomes gastriques des individus de type sécréteur. De plus, l'ordre d'apparition des antigènes i et I n'est pas invariable durant le développement;

Les observations, faites sur l'expression des antigènes i et I à des étapes spécifiques du développement embryonnaire de la souris, ont permis d'examiner la spécificité de l'anticorps monoclonal dirigé contre le SSEA-1. Ce dernier apparaît au stade huit cellules du développement embryonnaire de la souris. L'anticorps monoclonal réagit avec des glycoprotéines du méconium humain et la liaison est inhibée spécifiquement par des oligosaccharides et des glycoprotéines contenant la séquence 3-fucosyl-N-acétyllactosamine (*structure 6*, Tableau VI) [*GOOI et al. (83)*].

Type 2		
1	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAc	anti-I (natural)
2	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAc 2,3 SAc	<i>M. pneumoniae</i>
3	Galβ1-4GlcNAcβ1 } Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1 }	must anti-I including step (natural)
4	Galβ1-4GlcNAcβ1 } Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1 } 2,3 SAc	<i>M. pneumoniae</i>
5	Galβ1-4GlcNAcβ1 } Gal/GalNAc	anti-I Ma (natural)
6	Galβ1-4GlcNAc 1,3 Fuca	Anti-SSEA-1 (anti-Le ^x)
7	Galβ1-4GlcNAcβ1 } Gal 1,3 Fuca	C1B12
8	Galβ1-4GlcNAc 1,2 Fuca	TRA-1-85 (anti-H)
9	Galβ1-4GlcNAc 1,2 1,3 Fuca Fuca	C14 (anti-Le ^x)
10	GalNAcα1-3Galβ1-4(or 3)GlcNAc 1,2 Fuca	TL5 (anti-A)
11	GalNAcα1-3Galβ1-4GlcNAc 1,2 1,3 Fuca ± Fuca	29.1 (anti-A)
Type 1		
12	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc/Glc	FC 10.2
13	Galβ1-3GlcNAc 1,4 Fuca	CF4 (anti-Le ^x)
14	Galβ1-3GlcNAc 1,2 Fuca	(Type 1 H antigen)
15	Galβ1-3GlcNAc 1,2 1,4 Fuca Fuca	NS10 (anti-Le ^x)
16	Galβ1-3GlcNAc 2,3 1,4 NeuAcα Fuca	19.9
17	GalNAcα1-3Galβ1-3GlcNAc and GalNAcα1-3Galβ1-4Glc 1,2 1,4 1,2 1,3 Fuca Fuca Fuca Fuca	G49 MH-2 (anti-ALe ^x Le ^y)

Tableau VI :

Structures glycaniques des Antigènes de Groupe Sanguin se comportant comme des Antigènes de la différenciation reconnus par des anticorps monoclonaux ou comme des Antigènes associés aux tumeurs

La structure antigénique I dans l'embryon de la souris peut être convertie, par une α 1-3 fucosylation, en structure antigénique SSEA-1. De plus, l'antigénicité de cette structure est totalement masquée dans les glycoprotéines contenant un résidu de fucose substituant le galactose par une liaison α 1-2 (*Structure 9, Tableau VI*).

Ainsi, il est immédiatement apparent que la majorité des changements rapides et conséquents de l'antigénicité, pendant l'embryogénèse et la différenciation, résulte de changements dans la glycosylation des glycoprotéines et des glycolipides. Les antigènes I, i et SSEA-1 ne sont pas les seuls antigènes relatifs aux groupes sanguins qui présentent des modifications durant l'embryogénèse. Les antigènes des groupes sanguins majeurs apparaissent et disparaissent également de manière ordonnée pendant le développement du fœtus humain (*Fig. 16, p.41*).

Comme pour les antigènes I, i, l'expression du déterminant SSEA-1 est différente pour l'homme et la souris. Chez la souris adulte, le SSEA-1 est limité à certaines zones du cerveau et du tractus génito-urinaire alors que chez l'homme, il est largement présent dans des cellules épithéliales et dans les glycoprotéines sécrétées [*FEIZI (128)*]. Cet antigène est un marqueur distinctif des granulocytes et est reconnu par un groupe d'anticorps monoclonaux tels le VEP 8 et le VEP 9 [*FEIZI (128)*]. Il y a beaucoup d'autres exemples d'antigènes glycaniques définis par des anticorps monoclonaux, qui se comportent comme des antigènes embryonnaires ou des antigènes associés aux tumeurs, dans certains types de cellules et comme des antigènes de la différenciation adulte normale, dans d'autres. Par exemple, les études réalisées avec l'anticorps monoclonal C 14, dirigé contre les adénomes du côlon humain, montrent que la structure 2'-3 difucosyl-N-acétyllactosamine (*LEWIS^x*) (*Structure 9, Tableau IV*) qui est reconnue, se comporte comme un antigène associé aux tumeurs du côlon d'une part et comme un antigène normal des granulocytes humains d'autre part [*BROWN et al. (85)*].

2. Les Antigènes basés sur la Structure de Type I

Ces structures se comportent aussi comme des antigènes normaux de la différenciation dans "certains tissus" de "certains individus" mais sont des antigènes associés aux tumeurs pour d'autres. L'anticorps monoclonal F.C. 10.2 a été sélectionné pour sa réaction avec les térato-carcinomes indifférenciés d'origine humaine d'une part et les tissus de l'endoderme du fœtus humain d'autre part. Le déterminant antigénique inclut une structure de Type I, qui est présente dans les glycoprotéines du tractus gastro-intestinal adulte.

Cependant, cet antigène ne peut pas être détecté dans les tissus endodermiques adultes. Ceci est dû à un masquage de l'antigénicité par des glycosylations périphériques donnant les structures antigéniques de groupe sanguin A, B, H, Le^a et Le^b. Des études plus détaillées ont montré que, dans le mucus gastrique adulte, le profil d'expression du déterminant F.C. 10.2 ressemble à celui du déterminant I (*Structure 5*, Tableau VI) reconnu par l'anti I (*Ma*). Ces deux déterminants sont normalement exprimés dans les glycoprotéines de mucine gastrique de la population "*non sécréteur*" mais absents de celles de la population "*sécréteur*". Ces glycoprotéines des "*non sécréteurs*" sont dépourvues du résidu de fucose lié en $\alpha 1-2$ (*déterminant antigénique du groupe sanguin H*) qui masque les déterminants F.C. 10.2 et I chez les "*sécréteurs*". Cependant, ces deux antigènes sont exprimés comme des antigènes associés aux tumeurs dans les adénocarcinomes gastriques de "*sécréteurs*", ceci probablement à cause d'une biosynthèse incomplète des antigènes de groupes sanguins A, B et H.

Un autre exemple d'antigène glycanique de cellules cancéreuses du côlon est l'antigène 19.9 basé sur le type I (*Structure 16*, Tableau VI) qui n'est autre que le $\alpha 2-3$ sialyl Lewis^a [MAGNANI *et al.* (81) ; HANSSON *et al.* (129)] L'antigène 19.9 se comporte comme un antigène associé aux tumeurs de l'épithélium du côlon. De plus, un glycolipide, incluant cette structure, a été détecté dans le méconium humain mais n'a jamais été mis en évidence dans des extraits tissulaires dérivant de donneurs sains. L'antigène 19.9 représente donc un antigène embryonnaire associé aux tumeurs [HANISCH *et al.* (130)]. L'antigène 19.9, comme le F.C. 10.2, est un antigène associé aux tumeurs dans les adénocarcinomes gastriques de "*sécréteurs*", alors que c'est un antigène normal appartenant à la structure glycanique des glycoprotéines des mucines gastriques de "*non sécréteurs*". Ceci est certainement le résultat d'une perte de l' $\alpha 1-2$ fucosylation des structures de type I et de type II. Une explication est que la biosynthèse incomplète des structures de groupe sanguin H (*Structures 8 et 14*, Tableau VI) laisserait libre le galactose terminal qui ainsi servirait d'accepteur pour l'action de l' $\alpha 2-3$ sialyltransférase intervenant dans la biosynthèse de l'antigène 19.9.

C. CONCLUSION

Il existe donc une étroite relation entre les antigènes de groupe sanguin et les antigènes s'exprimant lors de changements durant les différentes étapes de l'embryogénèse, de la différenciation et de l'oncogénèse.

Ce concept est en accord avec les observations de SZULMAN (131), à savoir que les antigènes de groupe sanguin sont exprimés à différents degrés dans les différents organes du fœtus et leur expression peut changer à différents stades du développement. Ces changements sont dus à une addition ou à une délétion de monosaccharide provoquée par une action coordonnée de plusieurs glycosyltransférases et peut être de glycosidases. Si une chaîne glycanique incomplète apparaît pendant la différenciation ou le changement néoplasique, les antigènes auparavant masqués deviennent démasqués. Ceci est l'explication de l'expression aberrante du déterminant antigénique I (Ma) dans les tissus gastriques cancéreux d'individus qui sont normalement "sécréteurs" de type A, B, H [PICARD *et al.* (90)].

Une approche différente pour l'investigation et l'identification de nouveaux glycanes marqueurs des tumeurs est de détecter les glycosyltransférases qui pourraient être responsables de leur synthèse.

VI. LES BASES ENZYMATIQUES DE LA GLYCOSYLATION ABERRANTE DANS LES TUMEURS

La glycosylation aberrante dans les cellules tumorales et leur corrélation avec l'oncogénèse est indubitablement l'un des problèmes majeurs qui doit être résolu. Dans de nombreuses cellules transformées, la défection d'un enzyme spécifique ou l'augmentation spécifique d'une activité enzymatique peut être démontrée comme la base d'une glycosylation aberrante [HAKOMORI (132)]. De nombreuses cellules transformées présentent une modification chimique dans les structures glycaniques mais souvent les activités enzymatiques responsables de telles modifications ne peuvent être démontrées. Par exemple, aucune corrélation n'est trouvée entre l'activité de la sialyltransférase transférant l'acide sialique du CMP-NeuAc vers le Gal (β 1-4) Glc (β 1-1) Céramide et le taux de GM₃ dans les fibroblastes embryonnaires infectés par un mutant du virus du sarcome de Rous. Les lymphomes de Burkitt contiennent une grande quantité de Gb₃ qui est défini par un anticorps monoclonal dirigé contre les antigènes du lymphome de Burkitt. Mais, l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse du glycolipide (UDP Gal : LacCer α galactosyltransférase) ne peut pas corrélérer exactement avec le taux de Gb₃ accumulé dans le lymphome de Burkitt [WIELS *et al.* (133)]. Il est possible que les structures glycaniques non seulement soient contrôlées par la quantité et la spécificité des glycosyltransférases mais soient également régulées par les complexes multiglycosyltransférasiques assemblés et organisés dans les membranes. Une telle organisation de glycosyltransférases peut être post-translacionnellement contrôlée par la phosphorylation ou la glycosylation des enzymes [IVATT (134)].

L'activité de LacCer : sialyltransférase pour la synthèse du GM₃ est réduite par déphosphorylation et est augmentée par les protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique. Bien que ces résultats soient préliminaires, la phosphorylation et la déphosphorylation peuvent réguler l'activité des glycosyltransférases.

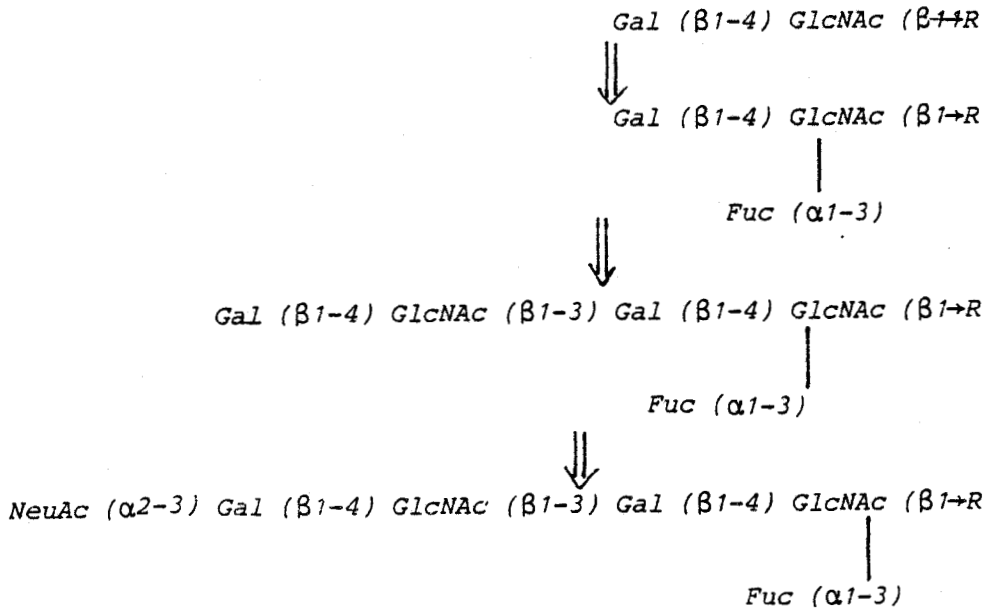
De plus, la conformation des oligosaccharides peut affecter la disponibilité d'un substrat pour les glycosyltransférases et les hydrolases [BRISSEON *et al.* (135)].

A. EXTENSION, FUCOSYLATION ET SIALYLATION DES GLYCANNES

Les études structurales entreprises par FUKUDA *et al.* (136) sur les glycolipides des granulocytes donnent des informations significatives sur les étapes de la biosynthèse de glycanes poly-N-acétyllactosaminiques. Il a été montré que la fucosylation intervient après que le résidu lactosaminique terminal soit formé et que le fucose substitue préférentiellement la N-acétylglucosamine subterminale, puis la N-acétylglucosamine interne [HOLMES *et al.* (137)]. Ces observations indiquent que l'extension précède la fucosylation. La voie de biosynthèse du schéma 1 (Fig. 18, p. 50) est peu vraisemblable alors que celle du schéma 2 semble corroborer ces observations.

La sialylation, précédant la fucosylation, peut expliquer pourquoi le résidu de fucose substitue la N-acétylglucosamine interne. La présence de l'acide sialique à l'extrémité terminale non réductrice entrave l'addition de fucose à la N-acétyllactosamine subterminale, qui substitue alors la N-acétylglucosamine interne. Récemment, des α 1-3 fucosyltransférases spécifiques ont été détectées dans une lignée cellulaire de cancer du poumon. Ces enzymes lient exclusivement le fucose en α 1-3 sur les N-acétylglucosamines et, apparemment, ajoutent des résidus de fucose aux chaînes lactosaminiques sialylées. D'autre part, il a été montré dans le lait humain que des activités α 1-3 et α 1-4 fucosyltransférasiques ne peuvent pas être séparées JOHNSON *et al.* (138). Dans ce système enzymatique, les fucosyltransférases ne peuvent pas ajouter de fucose aux substrats sialylés. La Table VII p.52 donne la liste des gangliosides fucosylés ayant deux résidus de N-acétylglucosamine pouvant être fucosylés. Dans toutes ces structures, les résidus de fucose sont liés uniquement à la N-acétylglucosamine interne ou aux deux sites. Cette observation corrèle avec le schéma 2 (Fig. 18, p.50), qui propose une sialylation suivie d'une fucosylation.

SCHEMA 1



SCHEMA 2

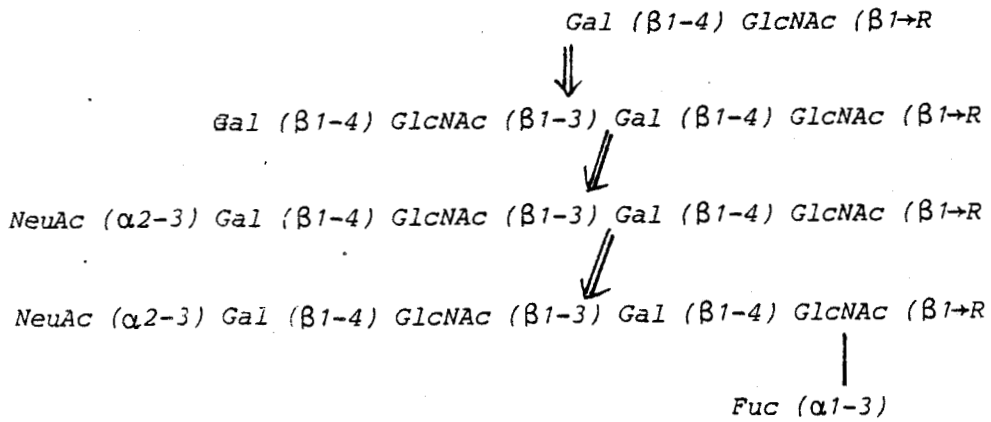


Fig. 18 :

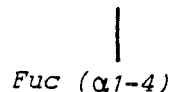
Extension, sialylation et fucosylation des glycanes
[FUKUDA, 1986]

Il est plausible que le fucose substituée préférentiellement la N-acétylglucosamine interne puis celle subterminale à cause de l'encombrement stérique provoqué par le résidu terminal d'acide sialique.

B. BIOSYNTHESE DES ANTIGENES ASSOCIES AUX CANCERS : LE SIALYL LEWIS^a ET LE SIALYL LEWIS^x

1. Le Sialyl LEWIS^a

Le sialyl Lewis^a est exprimé dans les gangliosides dès les premières étapes du développement. Il est également isolé des gangliosides du méconium. Cet antigène est perdu par les cellules intestinales normales chez l'adulte mais est exprimé dans les glandes salivaires, dans les mucines salivaires, dans le plasma sérial et dans des oligosaccharides du lait humain. Les cellules tumorales des tissus gastro-intestinaux possèdent l'antigène sialyl Lewis^a dans leurs structures glycaniques (et les mucines sécrétées). Comme l'ont montré HANSSON et ZOPF (139) (Fig. 19, p. 52), la biosynthèse du sialyl Le^a requiert l'action d'une Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc $\alpha 2-3$ sialyltransférase ainsi que l'action de l'enzyme Lewis. Ceci a lieu dans les cellules pouvant synthétiser les chaînes précurseurs de type I. L'enzyme qui ajoute le fucose à la chaîne précurseur de type I pour former Fuc ($\alpha 1-3$) Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc est présent chez les individus portant le gène sécréteur Se et la co-expression de cet enzyme avec l'enzyme Lewis résulte en la biosynthèse de l'antigène Lewis^b

$$\text{Fuc } (\alpha 1-2) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } \dots$$


Cette compétition, pour le même substrat, entre la fucosyltransférase qui forme Fuc ($\alpha 1-2$) Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc ... et la sialyltransférase qui forme NeuAc ($\alpha 2-3$) Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc ... peut être la base de la faible expression de l'antigène sialyl Le^a dans la salive de patients Lewis^b sécréteurs. Enfin, l'étape finale de la biosynthèse de l'antigène sialyl Lewis^a nécessite l'action d'une N-acétylglucosamine $\alpha 1-4$ fucosyltransférase.

2. Le Sialyl LEWIS^x

HOLMES *et al.* (127) montrent que la biosynthèse des structures de Type II portant le déterminant Le^x débute par une élongation, puis par la substitution de fucose en $\alpha 1-3$ sur le pénultième résidu de N-acétylglucosamine de la chaîne glycanique.

VI ³ NeuNAcIII ³ FucnorLcnOse ₄ Cer	NeuNAcα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	3	
		↑α	
		1	
		Fuc	
VI ⁶ NeuNAcIII ³ FucnorLcnOse ₄ Cer	NeuNAcα2→6Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	3	
		↑α	
		1	
		Fuc	
VI ³ NeuNAcV ³ III ³ Fuc ₂ norLcnOse ₄ Cer	NeuNAcα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	3	3
		↑α	↑α
		1	1
		Fuc	Fuc

Tableau VII :

**Structures des
Fucosylnorhexaosylcéramides sialylés**

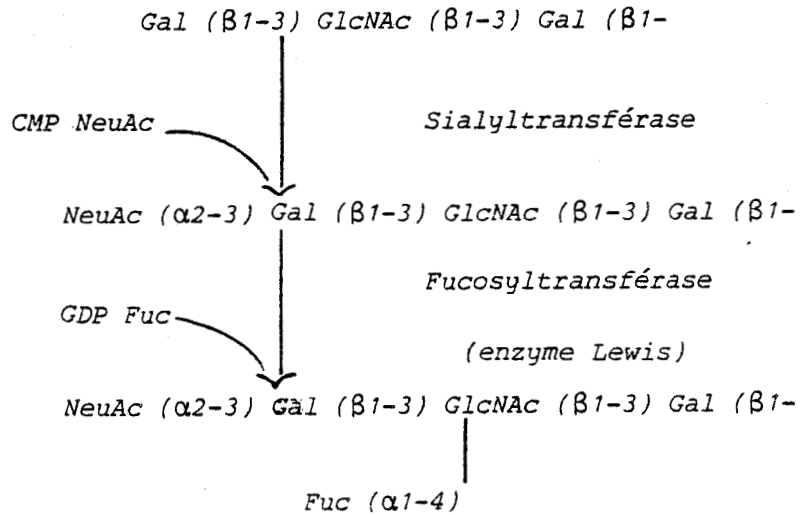


Fig. 19 :

**Voie de Biosynthèse de l'Antigène sialyl Lewis ^a
[HANSSON, 1985]**

Lors d'étapes ultérieures, un ou plusieurs résidus de fucose peuvent être ajoutés aux résidus internes de N-acétylglucosamine pour former les structures di- et trimériques Lewis^X. Il semble que ce soit le même enzyme qui transfère le fucose sur les résidus internes de N-acétyllactosamine tel le pénultième résidu de N-acétyllactosamine. La biosynthèse des dérivés Lewis^X sialylés en α 2-3 ou en α 2-6 nécessite l'action de sialyltransférases spécifiques qui opèrent avant la fucosylation de la pénultième N-acétyllactosamine et des N-acétyllactosamines internes. Ce processus de biosynthèse est analogue à celui évoqué pour le sialyl Lewis^a décrit précédemment par HANSSON et ZOPF (139).

C. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Selon l'hypothèse d'HAKOMORI (123), la glycosylation aberrante est causée par un changement organisationnel des enzymes et le mécanisme induit peut être une modification post-translationnelle de l'enzyme, telles la phosphorylation et la glycosylation. Un changement réversible de la synthèse des glycolipides, comme la synthèse incomplète, déclenchée par l'activation d'un oncogène, peut être causé par un changement post-translationnel ou transcriptionnel de gènes de glycosyltransférases.

En dépit des connaissances structurales de la glycosylation aberrante dans les cellules tumorales, nous possédons peu d'informations à propos de sa signification biologique. Les modèles de glycosylation corroborent-ils le degré de malignité ? ou le potentiel métastatique ? ou sont-ils la cause de reconnaissance et d'adhésions cellulaires aberrantes ?

De nombreuses anomalies de la vie sociale des cellules tumorales peuvent être examinées en fonction des structures glycosylées rencontrées. Un certain nombre de variantes de mélanomes, de sarcomes et de lymphomes semblent corrélés avec le degré de sialylation [VOGEESSWARAN et SALK (140)], avec l'exposition du résidu *GaINAc* → *Gal* [ALTEVOGT et al. (141)] et avec la présence d'une lectine associée à la tumeur qui induit une aggrégation homotypique des cellules tumorales [LOTAN et RAZ (142)].

L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-saccharides appliqués aux plaques de couche mince [MAGNANI et al. (143)] intensifie les connaissances sur les bases structurales de la glycosylation aberrante dans les tumeurs et ces connaissances donneront des indices pour des études biologiques ultérieures.

Depuis qu'un rôle possible des gangliosides dans l'adhésion cellulaire a été postulé [CHERESH *et al.* (144)], le rôle spécifique des gangliosides dans l'adhésion cellulaire et ses modifications dans les cellules transformées peut être un important sujet de recherche dans un avenir proche. La présence d'une importante concentration de GD₂ et de GD₃ dans la matrice cellulaire des mélanomes peut être en corrélation avec les propriétés d'infiltration des mélanocytes. La reconnaissance cellule-cellule s'effectue par des interactions spécifiques entre les glycoconjugués des membranes et les protéines de reconnaissance. Dans les tumeurs, une composition altérée des glycoconjugués de la surface cellulaire peut résulter en une déficience dans la reconnaissance cellulaire.

L'URINE DE FUCOSIDOSE

La fucosidose est une des glycoprotéinoses, maladies métaboliques caractérisées par un déficit total ou partiel de l'activité de certaines hydrolases lysosomiques et par l'accumulation dans les tissus et les urines de matériel glucidique résultant du catabolisme incomplet des glycoprotéines.

La fucosidose, découverte par *DURAND* (145) est une maladie métabolique héréditaire qui se traduit par un déficit en α -L-fucosidase et par une accumulation de fuco-glycolipides, de fuco-glycopeptides et de fuco-oligosaccharides dans les urines et dans les tissus. Ses particularités cliniques sont, outre une atteinte plus ou moins précoce et rapide du système nerveux central, une angiokératose diffuse tardive (*uniquement après l'âge de 4ans*), ces critères permettant de distinguer une forme précoce d'une forme tardive.

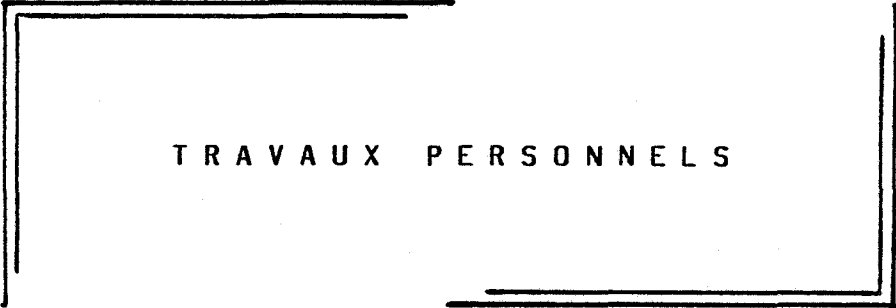
L'étude des glucides libres et conjugués présents dans les urines constitue une voie d'approche privilégiée du problème des glycoprotéinoses, car la nature des constituants qui s'y accumulent peut être considérée comme le reflet exact des anomalies métaboliques de l'organisme. Il est cependant nécessaire de connaître au préalable les glucides habituellement présents dans l'urine normale, dont le taux peut varier en fonction de facteurs physiologiques et génétiques divers. L'intérêt de l'étude des glyco-asparagines de l'urine humaine réside dans le fait que ces composés sont doués, pour la plupart, d'activités de groupes sanguins. Dans le cas de la fucosidose, la nature des glucides accumulés varie avec les phénotypes ABH, Lewis, Secréteur et, en particulier, le taux de ces fucosides urinaires est relativement bas chez les sujets non sécréteurs.

Il est intéressant de constater que plus de 80 % du matériel accumulé l'est sous forme de glyco-asparagines indiquant ainsi une inhibition de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase par les résidus de fucose.

De tels composés fucosylés ont, par ailleurs, été identifiés dans le cerveau et dans les fibroblastes en culture de sujets atteints de cette maladie [*TSAY et DAWSON* (146)].

L'étude des urines de malades atteints de fucosidose est motivée par le fait que ce milieu, tout comme le méconium, se trouve en relation directe avec le métabolisme des antigènes tissulaires.

Le but de notre travail étant de déterminer la structure primaire de N-glycannes renfermant du fucose et susceptibles, par conséquent, de porter l'activité antigénique X, l'urine de fucosidose constitue donc un milieu de choix.



TRAVAUX PERSONNELS

**STRUCTURE PRIMAIRE DE TREIZE GLYCO-ASPARAGINES
ISOLES DU MECONIUM HUMAIN**

Une étude R.M.N. du proton ^1H à 400 MHz

Le méconium humain est une source riche de glycanes. Il contient du matériel dérivant principalement des cellules de la muqueuse intestinale du fœtus. Nous décrivons ici les structures de treize glyco-asparagines établies par la R.M.N.- ^1H à haute résolution. L'origine de ces composés est discutée en regard du processus de catabolisme agissant dans le tractus intestinal foetal.

I. MATERIELS ET METHODES

A. MATERIELS

Les gels pour la chromatographie de tamisage moléculaire (Biogel P2) et les différentes résines échangeuses d'ions Dowex sont obtenus des Laboratoires Bio-Rad (U.S.A.). Les plaques de chromatographie couche mince sur gel de silice (Kieselgel 60) proviennent de la Société MERCK (R.F.A.).

B. PREPARATION DE LA FRACTION GLUCIDIQUE

2 kg de méconium, provenant de 80 nouveaux-nés, sont homogénéisés dans 3 litres d'eau distillée. Après un repos de 4 heures, à température ambiante, le matériel insoluble est séparé par centrifugation. Le surnageant est concentré à 1 litre par évaporation sous pression réduite et le matériel macromoléculaire est ensuite précipité par addition de 1,5 litres d'éthanol à 96 %. Après centrifugation, le surnageant est évaporé à sec et le résidu est dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le matériel insoluble est alors séparé par filtration sur laine de verre. La solution est ensuite déminéralisée par passage sur des colonnes (4 x 40 cm) de résines Dowex 50 x 8, 25-50 mesh, forme H^+ et Dowex 1 x 8, 25-50 mesh, forme HCOO^- respectivement. L'effluent est alors soumis à une chromatographie d'adsorption sur une colonne (5 x 40 cm) d'un mélange de charbon-célite (1:1 en poids). Après lavage par 5 litres d'eau distillée, la fraction glucidique est désorbée par 10 litres d'éthanol à 50 %. Cet éluat est alors évaporé à sec et le résidu est repris par 1 litre d'eau.

C. FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1. Chromatographie d'Echange d'Ions

La solution contenant le matériel glucidique est passée sur une colonne (4,5 x 50 cm) de Dowex 50 x 2, 200-400 mesh, sous forme H⁺. Après lavage par 2 litres d'eau distillée, la désorption est achevée par un gradient discontinu de tampon acétate de pyridine (pH 5,5) de molarité croissante : 2, 4, 6, 8 mM ... ; 3 fois 1 litre de chacun des éluants sont appliqués.

Chaque fraction glycopeptidique, obtenue après chromatographie d'échange d'ions est dessalée sur une colonne de Biogel P2 (2 x 50 cm) avec de l'eau distillée comme éluant.

2. Chromatographie liquide haute pression (C.L.H.P.)

a. Principe

La séparation chromatographique, fondée sur la différence de distribution des composés d'un échantillon entre deux phases non miscibles, se fait par transport des molécules dans la phase mobile au travers d'un lit de matériaux constituant la phase stationnaire. Pendant ce transfert, la phase stationnaire retarde les molécules en les retenant plus ou moins en fonction de leur interaction avec les phases mobile et stationnaire. Grâce à l'utilisation de phases stationnaires de fine granulométrie, au contrôle du débit de la phase mobile par des pompes à haute pression et à la mise au point de méthodes sensibles de détection en continu de la composition de l'effluent, on réalise des chromatographies très performantes en des temps très courts.

b. Technique utilisée

1 mg d'échantillon dissous dans 100 µl d'une solution H₂O-acétonitrile (60:40) et clarifié par filtration (filtre 0,45µm, Millipore) est analysé en C.L.H.P. sur une colonne échangeuse d'anions Micropack AX-10, diamètre des billes de silice greffée : 10 µm (0,4 x 30 cm, Varian)

Pour cela, nous disposons d'un chromatographe Spectra-Physics (COURTABOEUF, France) comprenant :

- un détecteur U.V. à longueur d'onde variable, modèle S.P. 8440
- un intégrateur informatisé, modèle S.P. 4270
- un appareil de confection de gradients ternaires, microprocesseurisé, modèle S.P. 8700
- une pompe et une boucle d'injection de 200 µl.

La détection des molécules est effectuée à 206 nm avec un détecteur U.V. réglé à une sensibilité de 0,16, l'intégrateur étant réglé à la sensibilité 8.

Le débit de l'éluant est de 1 ml/mn. La pression maximale est fixée à 200 bars.

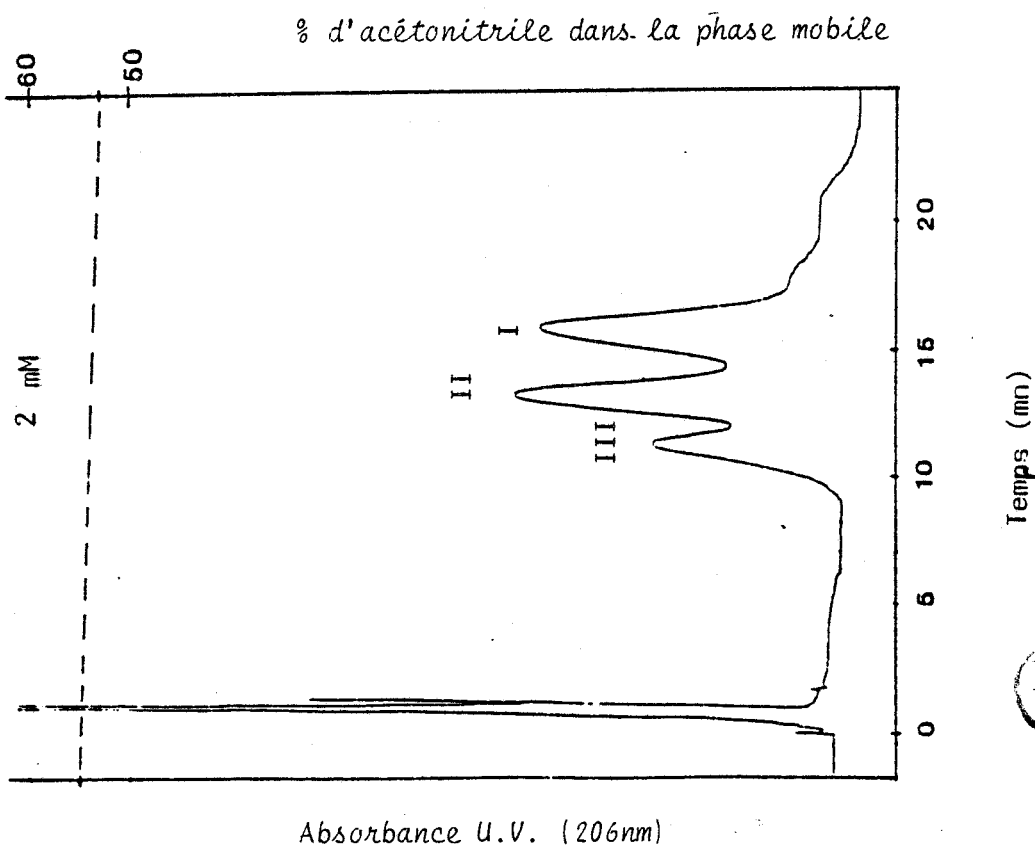
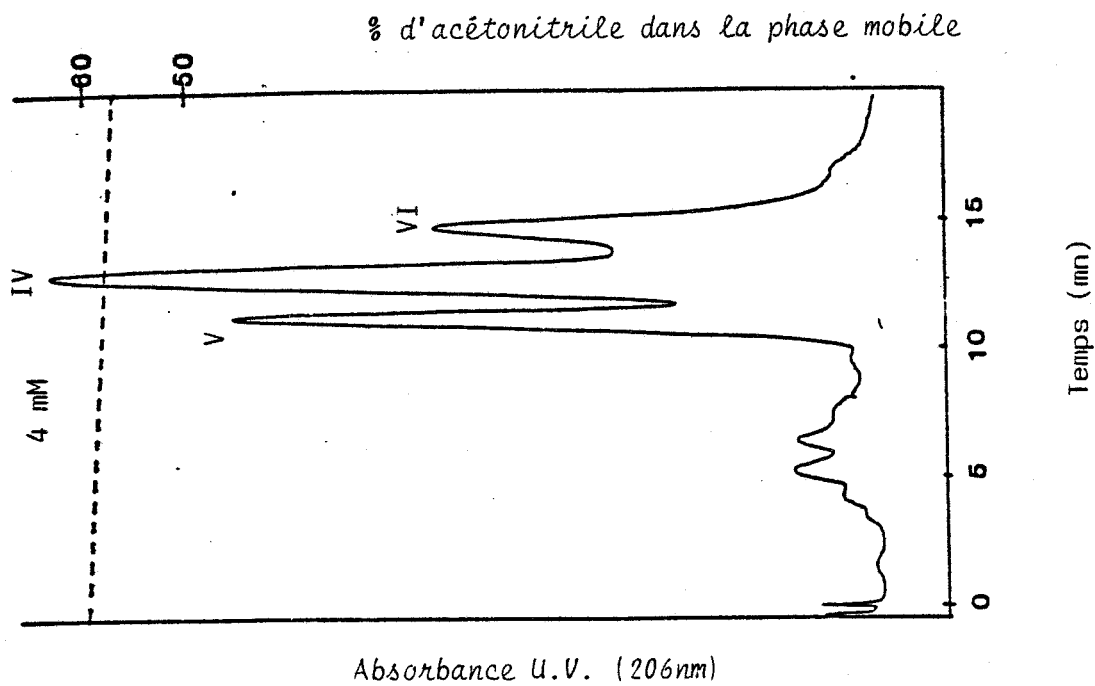
Les gradients utilisés pour les différentes fractions sont les suivants :

Fraction	Temps 0 : % acétonitrile	Temps 60 mn : % acétonitrile
2 mM	55	50
4 mM	60	50
6 mM	60	50
8 mM	50	50

c. Résultats

Les Fig. 20 p.60 et 21 p.61 illustrent les résultats de la chromatographie liquide haute pression pour chacune des fractions éluées de la résine Dowex 50 x 2.

La fraction élue à la concentration 2 mM en acétate de pyridine donne essentiellement trois pics majeurs notés I, II, III. Le profil d'éluion de la fraction 4mM montre essentiellement trois pics (appelés IV, V, VI). La fraction 6 mM donne un pic unique (noté VI) tandis que la fraction 8 mM présente deux pics (VII, VIII).



Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.) sur colonne AX 10
des fractions 2mM et 4mM

Fig. 20 :



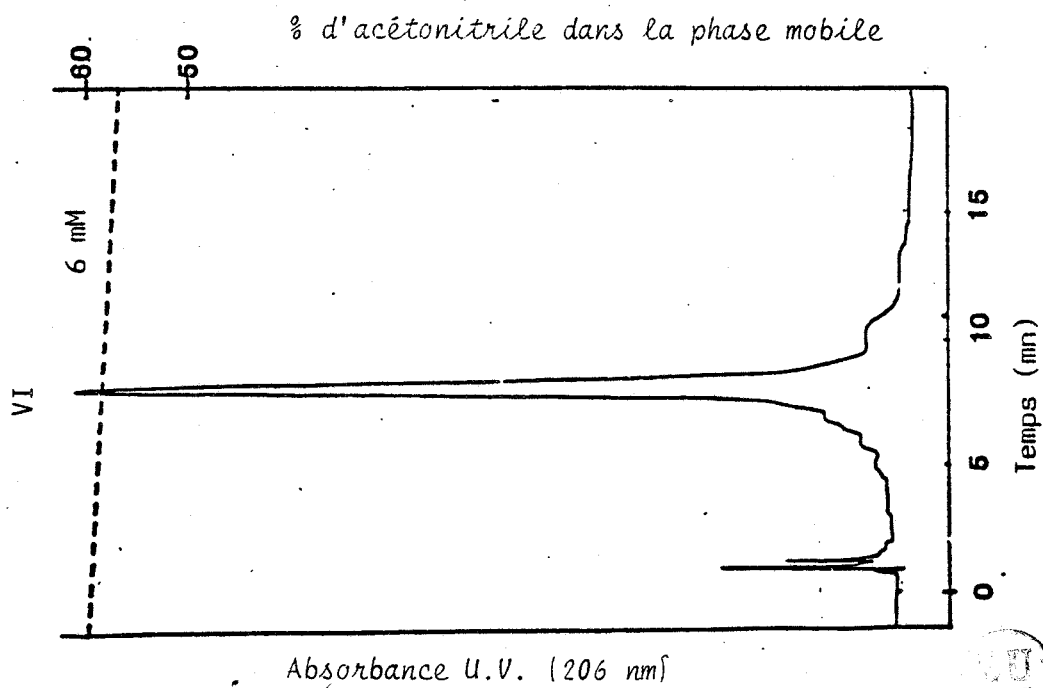
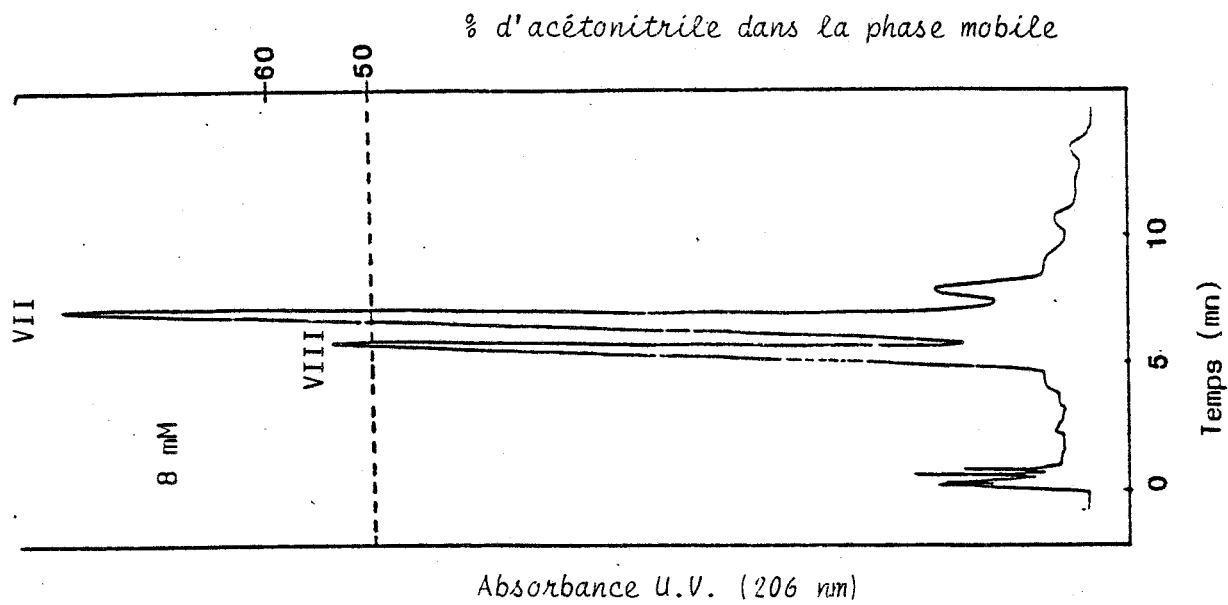


Fig. 21 :

Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.) sur colonne AX 10
des fractions 6mM et 8mM

Chaque pic détecté à 206 nm est chromatographié sur couche mince (*Silicagel 60, Merck*) dans le système solvant éthanol-n-butanol-pyridine-eau-acide acétique (100 : 10 : 10 : 30 : 3 vol/vol). La révélation des plaques se fait par le réactif à l'orcinol sulfurique. Le profil chromatographique sur couche mince révèle une certaine hétérogénéité, prouvant la présence de plusieurs composés dans chaque fraction (Fig. 22, p. 63).

II. ANALYSE R.M.N. DU PROTON A 400 MHZ*

Chaque fraction obtenue par C.L.H.P. est ensuite analysée et identifiée par spectroscopie R.M.N. du proton à 400 MHz.

A. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz a été réalisée sur un spectromètre BRUKER AM400-WB à transformée de FOURIER couplé à un ordinateur ASPECT 3000. Les analyses ont été effectuées à 300° K (27 °C).

Les fractions de glyco-asparagines sont échangées plusieurs fois dans de l'eau deutériée D_2O 99,95 % (C.E.A., France) avec des étapes intermédiaires de lyophilisation.

Les glissements chimiques sont mesurés par rapport au sodium -4-4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate (*indirectement par rapport à l'acétone dans D_2O : $\delta = 2,225$ p.p.m*) et sont exprimés en parties par million (p.p.m).

B. RESULTATS

Les spectres de R.M.N. à 400 MHz sont interprétés selon *VLIENGHART et al.* (147). Les paramètres de l'étude R.M.N. des fractions I à VIII sont compilés dans le Tableau VIII p. 64.

L'analyse confirme l'hétérogénéité observée après la chromatographie sur couche mince et permet de préciser la nature des différents isomères présents dans ces fractions.

* Les analyses ont été effectuées au Centre Commun de Mesures de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE - FLANDRES - ARTOIS par M. Jean-Michel WIERUSZESKI que nous remercions.

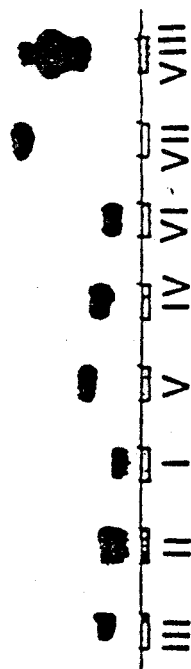
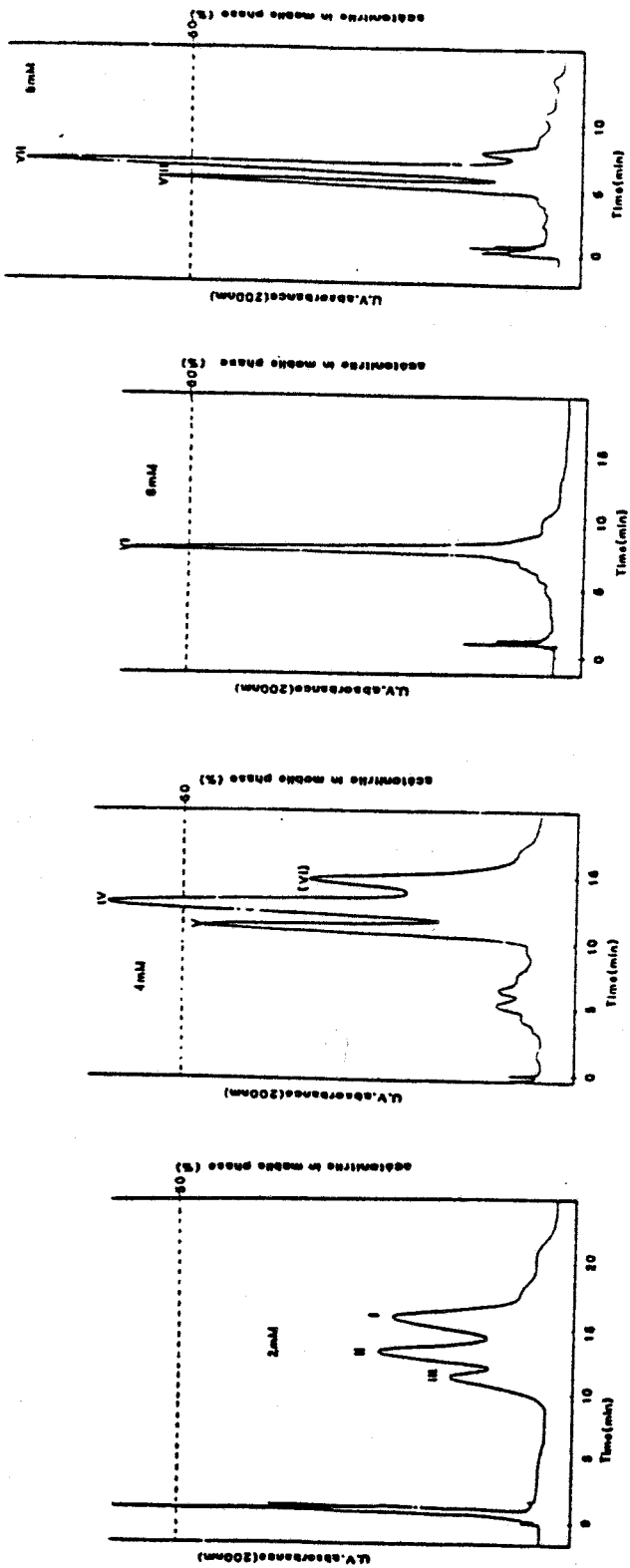


Fig. 22 :

Profils chromatographiques des 8 fractions de glyco-asparagine
(C.L.H.P. et C.C.M.)



	I	III A, IV A	III B	II A, IV C	II B, IV B	V A	V B	V C	VI A	VI B	VII A	VII B	VIII
H-1 de 1'	5 071	5 071	5 071	5 071	5 071	5 070	5 070	5 070	5 071	5 071	5 071	5 071	5 072
2	4 675	4 683	4 636	4 676	4 676	4 683	4 683	4 683	4 686	4 684	4 686	4 632	4 687
3	4 688	4 765	4 765	4 688	4 694	4 776	4 766	4 766	≈ 4 75	n.d.	≈ 4 75	≈ 4 75	4 766
4	5 054	5 119	5 119	5 053	4 053	5 119	5 099	5 119	-	5 121	-	-	-
4'	5 007	4 923	4 923	5 007	4 994	4 915	4 915	4 920	4 917	-	4 910	4 910	4 913
5	4 576	4 580	4 580	4 552	4 576	4 570	-	4 546	-	n.d.	-	-	-
5'	4 576	4 580	4 580	4 581	4 540	-	4 570	4 546	4 577	-	4 548	4 548	-
6	4 468	4 466	4 466	-	4 469	4 465	-	-	-	4 468	-	-	-
6'	4 476	4 472	4 472	4 476	-	-	4 470	-	4 471	-	-	-	-
9	4 462	-	-	4 462	4 462	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuc	4 885	4 887	-	4 887	4 879	4 873	4 876	4 876	4 877	4 877	4 875	-	4 875
H-2 de 3	4 175	4 246	4 246	4 174	4 178	4 250	4 250	4 250	4 078	4 25	4 078	4 078	4 080
4	4 255	4 189	4 189	4 246	4 255	4 186	4 066	4 186	-	4 19	-	-	-
4'	4 141	4 11	4 11	4 137	4 145	<4	4 105	4 11	4 094	-	4 094	4 094	3 965
H-5 de Fuc	4 120	4 107	-	4 122	4 122	4 119	4 19	4 119	4 123	4 123	4 120	4 120	4 121
CH ₃ de Fuc	1 203	1 206	-	1 205	1 205	1 203	1 203	1 203	1 207	1 207	1 206	-	1 208
MAC de 1	2 016	2 016	2 016	2 016	2 016	2 016	2 016	2 016	2 017	2 016	2 016	2 016	2 016
2	2 093	2 091	2 076	2 094	2 090	2 090	2 090	2 090	2 094	2 090	2 091	2 070	2 092
5	2 054	2 050	2 050	2 056	2 056	2 050	-	2 054	-	2 043	-	-	-
5'	2 040	2 046	2 046	2 040	2 040	2 048	-	2 045	2 050	-	2 050	2 059	-
9	2 063	-	-	2 067	2 063	-	-	-	-	-	-	-	-

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glyco-asparagines I et VIII

Tableau VIII :



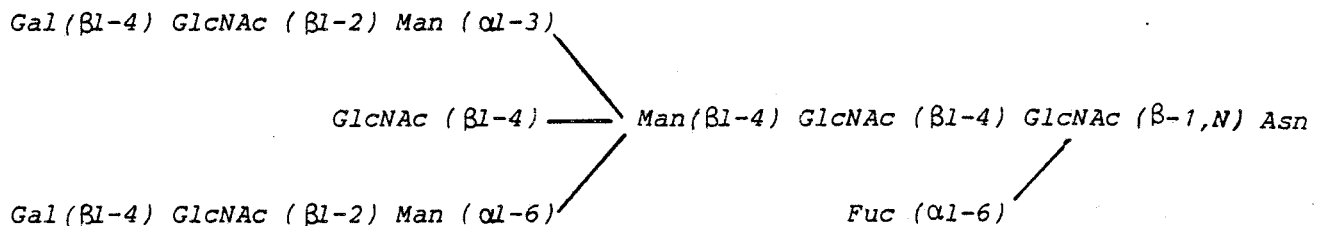
Le spectre R.M.N. du glyco-asparagine I (Fig. 23, p. 66) révèle un profil caractéristique d'un asialoglycane bi-antenné portant un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire (GlcNAc-9) substituant en $\beta 1-4$ le résidu de mannose 3.

La présence du résidu de GlcNAc-9 est démontrée par le singulet du groupement N-acétyl à $\delta 2.063$ et par le doublet du proton anomérique à $\delta 4.462$. La présence de la GlcNAc-9 est aussi déterminée par les déplacements chimiques des doublets des protons H-1 des Man-4 et Man 4 qui sont observés à $\delta 5.054$ et $\delta 5.007$ respectivement, au lieu de $\delta 5.121$ et $\delta 4.928$ trouvés pour l'asialoglycane de la sérotransferrine donnée en structure de référence (Fig. 24 p. 67).

(voir les paramètres significatifs des glycanes III A et IV A).

L'influence du GlcNAc-9 produit également un glissement vers les champs faibles du signal H-2 du Man-4 ($\Delta\delta = +0,055$ p.p.m.) et un glissement vers les champs forts du signal H-2 du Man-3 ($\Delta\delta = -0,071$ p.p.m.). Le glyco-asparagine I contient un résidu de fucose lié en $\alpha 1-6$ sur la GlcNAc-1, mis en évidence par le groupe des glissements chimiques des protons représentatifs du fucose ($\delta H-1$ 4.885 ; $\delta H-5$ 4.120 et δCH_3 1.203) et le déplacement vers les champs faibles du groupement méthyl de l'acétamido de GlcNAc-2 (comparer avec les structures III B). Le signal H-1 des résidus Gal 6/6' et GlcNAc 5:5' n'ont pas de déplacements significatifs au regard de l'asialoglycane de type bi-antenné ($\Delta\delta^{\pm} 0,004$ p.p.m.).

Sur la base des résultats de la spectroscopie R.M.N.- 1H à 400 MHz, le glyco-asparagine I possède la structure suivante :



Le glyco-asparagine II (Fig. 25, p.68) contient le résidu de GlcNAc-9 vérifié par les présences d'un doublet à $\delta 4.462$ et du singulet à $\delta 2.063$. Les résidus de Gal 6 et 6' sont présents, comme le montrent les doublets H-1 à $\delta 4.469$ et $\delta 4.476$. Cependant, le doublement des signaux H-1 des Man-4', Man-3 Fuc et GlcNAc 5/5' indique clairement que la structure II est un mélange de deux isomères, II A et II B (p. 69)

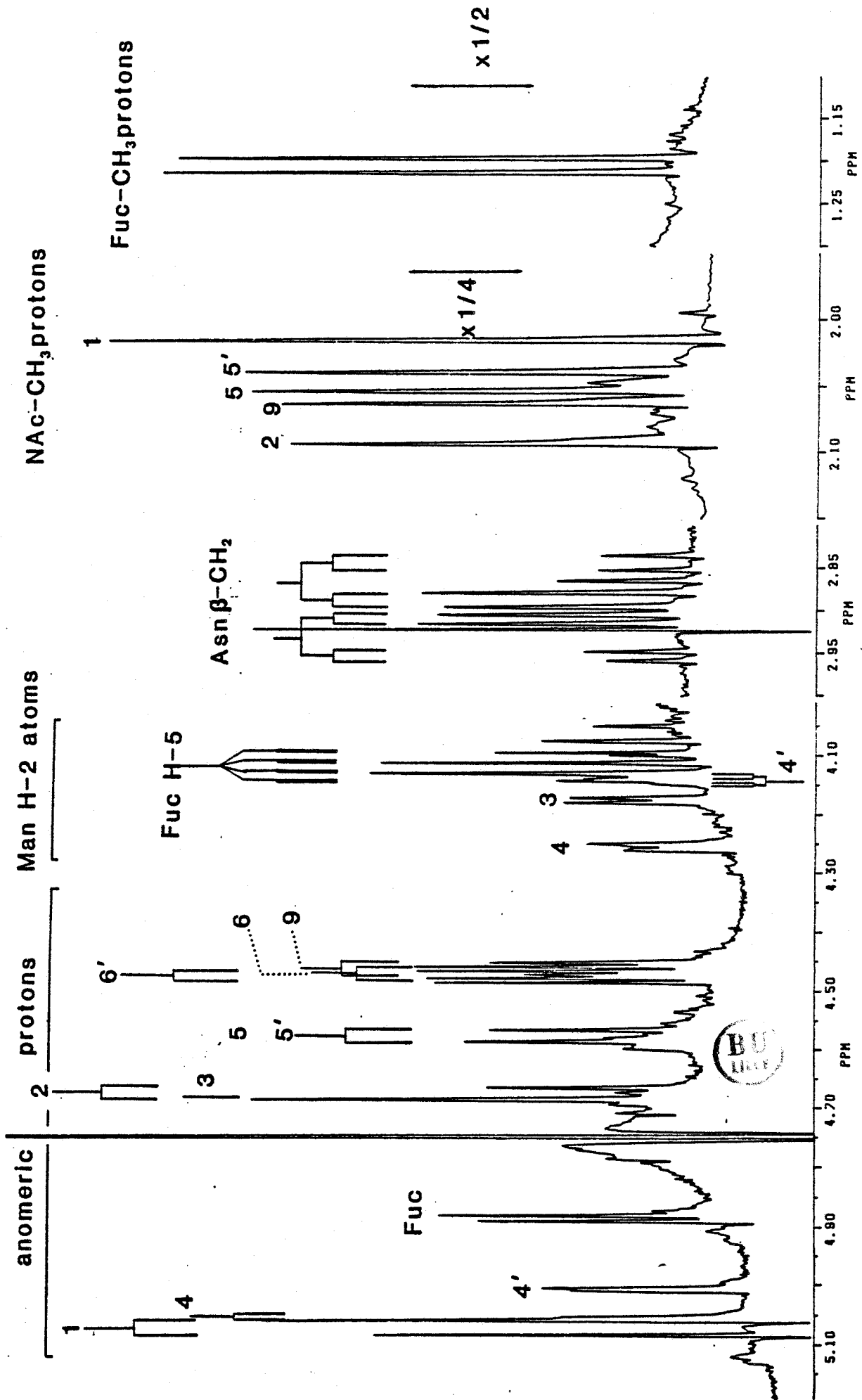


Fig. 23 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction I

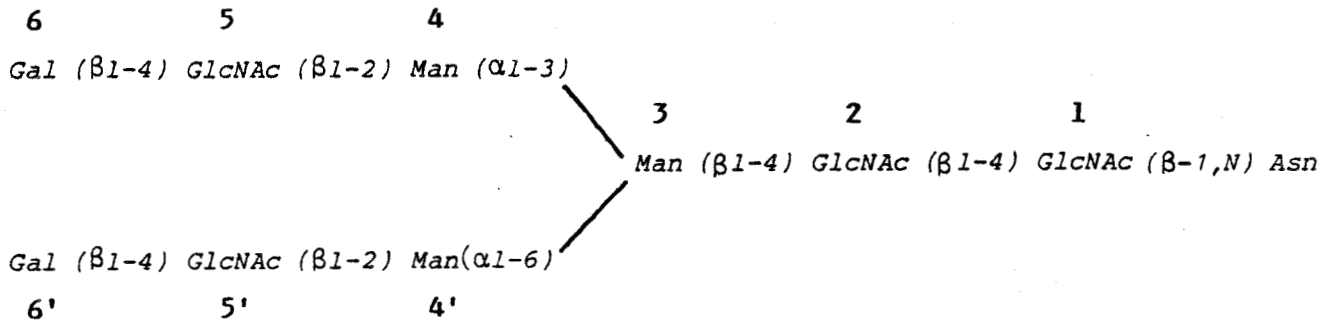


Fig. 24 :

Structure et nomenclature de l'asialoglycane
 de référence isolé de la sérotransferrine humaine
 [PIK, 1974 (161) ; DORLAND, 1977 (148)]



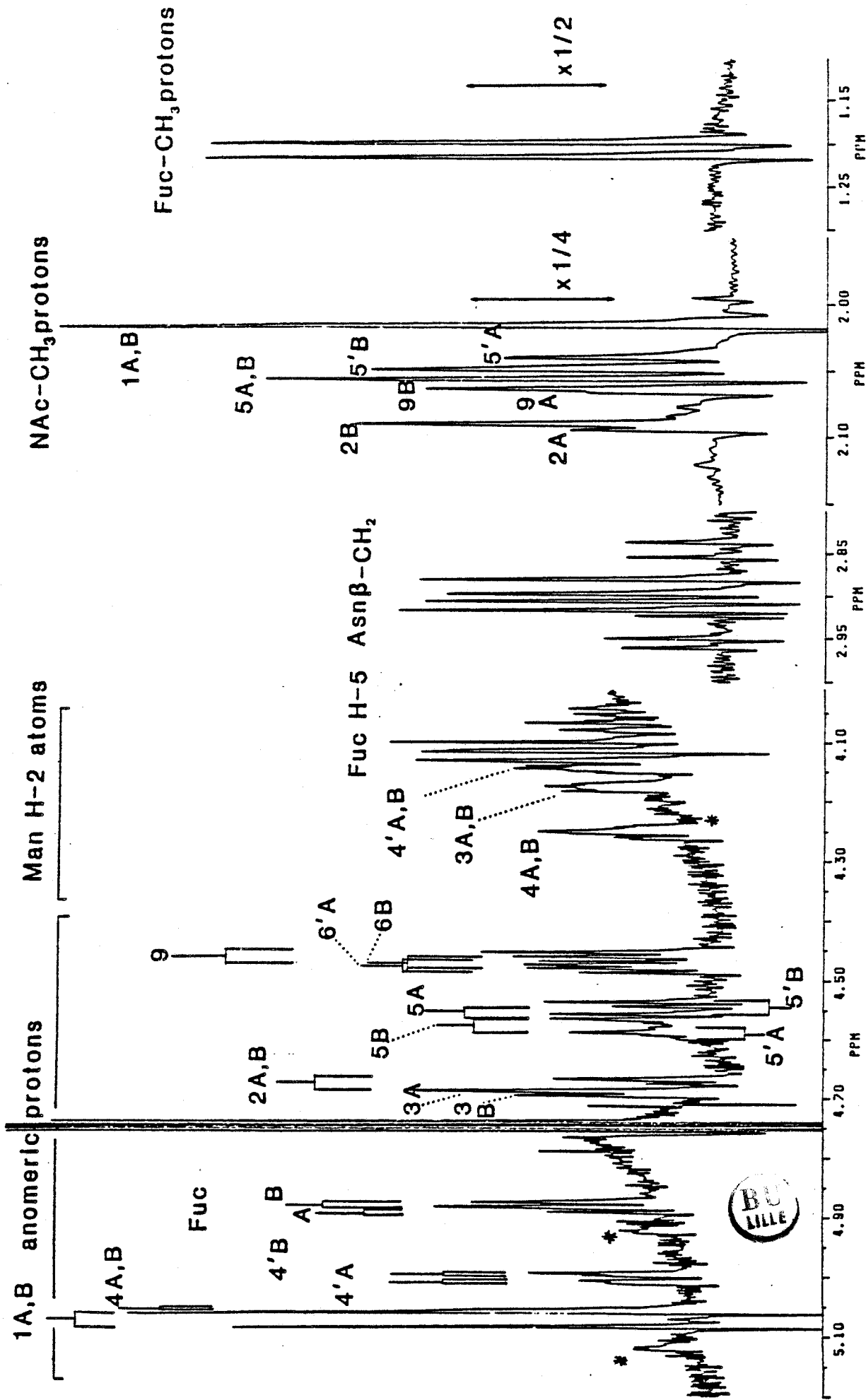
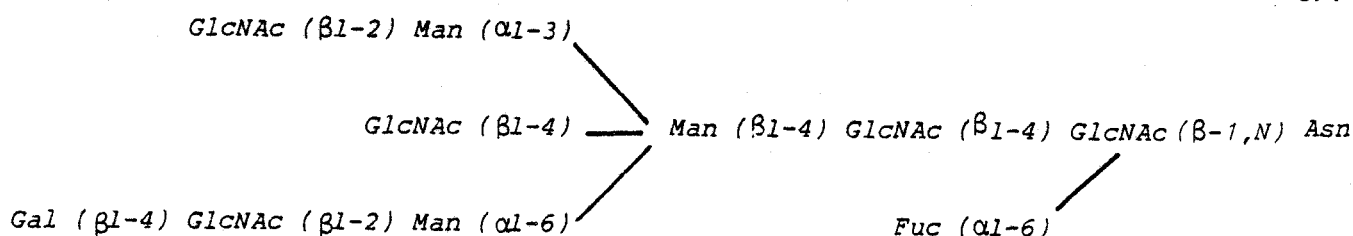
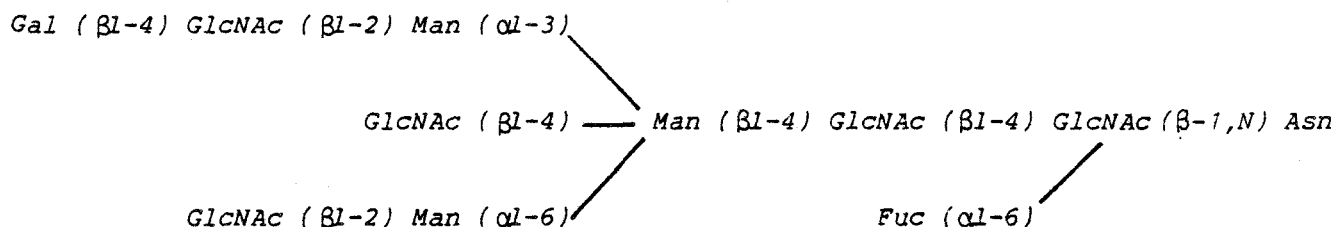


Fig. 25 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction II



II B :



Le spectre de chacun des composés est facilement interprétable, en tenant compte du fait que le signal H-1 de Gal-6' a une intensité plus faible que celui de Gal-6. Ceci conduit à un rapport IIB/IIA \approx 3:2. Les déplacements chimiques des protons H-1 de Man-4' de II A et II B sont trouvés à δ 5.007 et δ 4.994 respectivement. Les signaux des protons anomériques du Fucose et de GlcNAc 5/5', des protons H-2 des Man-3 et 4', CH_3 des groupements acétamido de GlcNAc-2 et 9 sont aussi dédoublés. Les signaux H-2 des Man-3,4,4' sont visibles après irradiation du CH_3 du Fucose (Homodécouplage) (Fig.26,p.70

En plus des composés II A et II B, l'échantillon II contient une faible proportion de glyco-asparagine ne possédant pas le résidu de GlcNAc-9 intercalaire, comme l'indiquent les signaux marqués d'un astérisque.

Les spectres R.M.N. des glyco-asparagines III et IV (Fig. 27, p.71 et Fig. 28, p. 72) présentent de nombreuses similitudes. Pour Man -4 et 4', les signaux H-1 sont trouvés à δ 5.119 et δ 4.923 pour les glycanes bi-antennés et à δ 5.053 ; δ 4.994 et δ 5.007 pour les glycanes incomplets contenant une N-acétylglucosamine intercalaire.

Le doublet du signal H-1 de Man-4' indique la présence de deux isomères déjà observés dans la fraction II. Une autre hétérogénéité de la fraction III est due à la présence d'un afucoglyco-asparagine prouvée par les signaux du proton H-1 et des protons du CH_3 du groupement acétamido de GlcNAc-2 qui résonnent à δ 4.636 et δ 2.076 respectivement.

Pour le glyco-asparagine majeur III A, les deux résidus de GlcNAc 5/5' sont substitués par des résidus de galactose (H-1 GlcNAc 5/5' à δ 4.580).

Trois doublets de faible intensité à δ 4.540 ; δ 4.552 ; δ 4.576 montrent la présence de III D et III E.

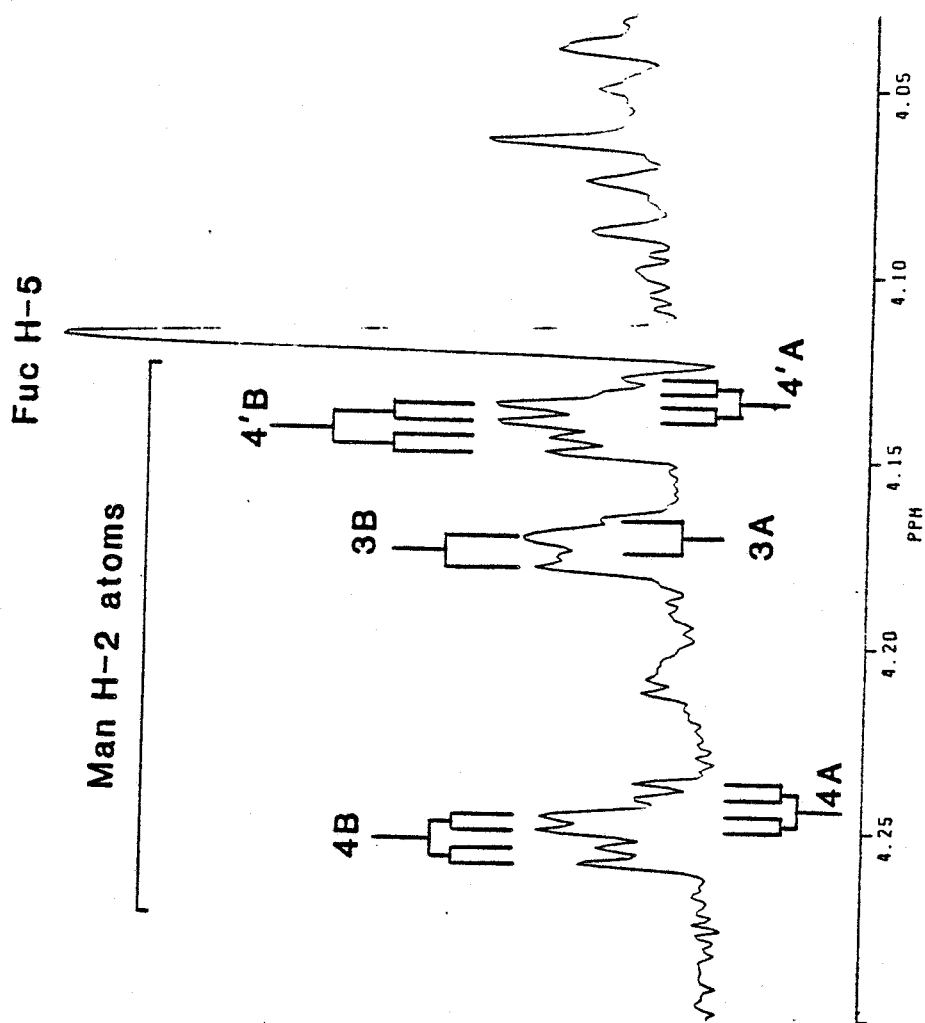


Fig. 26 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz montrant les signaux des protons H-2 des Man-3,4,4' de la fraction II après irradiation du doublet du méthyl du fucose à $\delta = 1.205$ p.p.m.



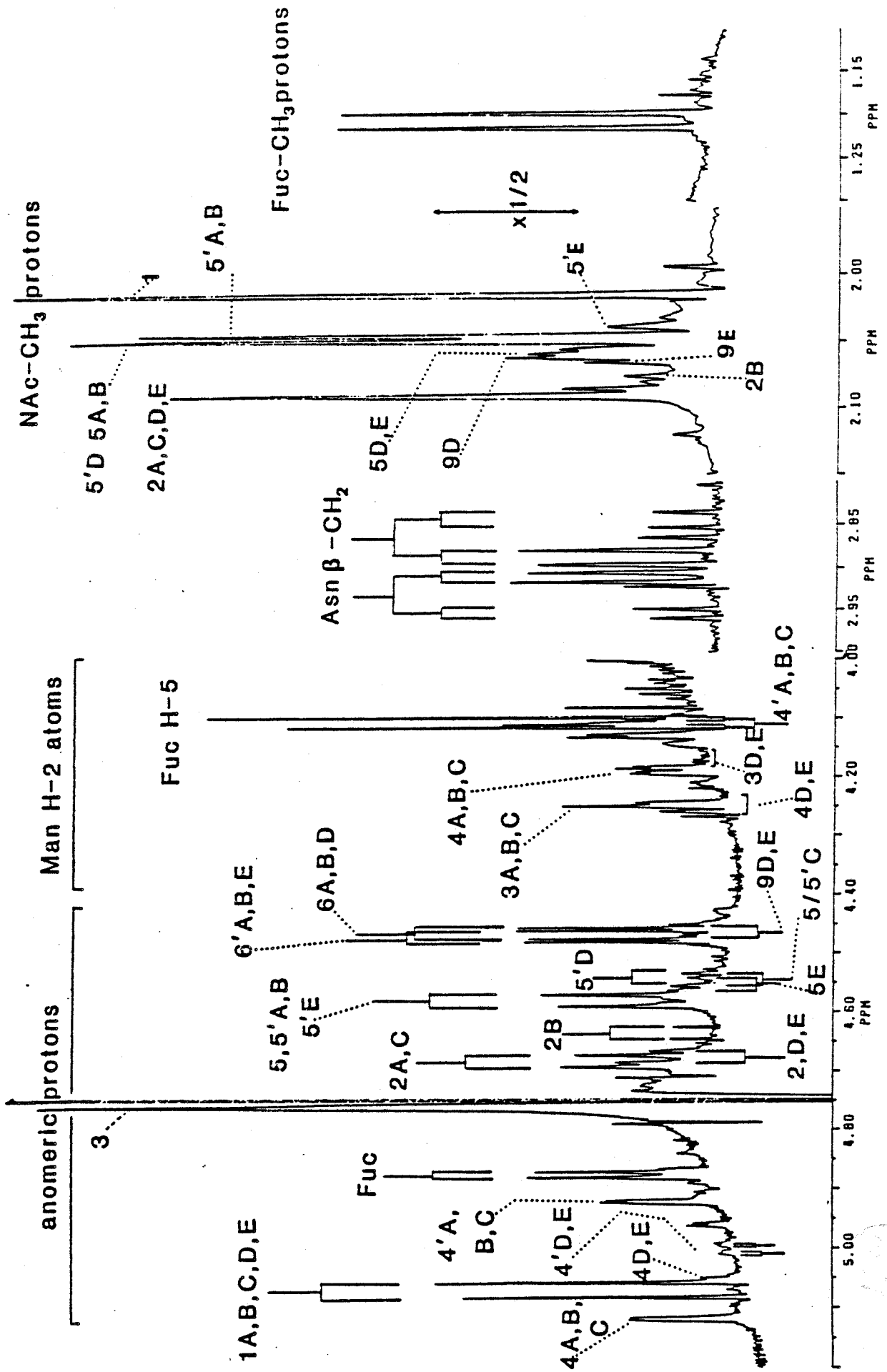


Fig. 27 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction III

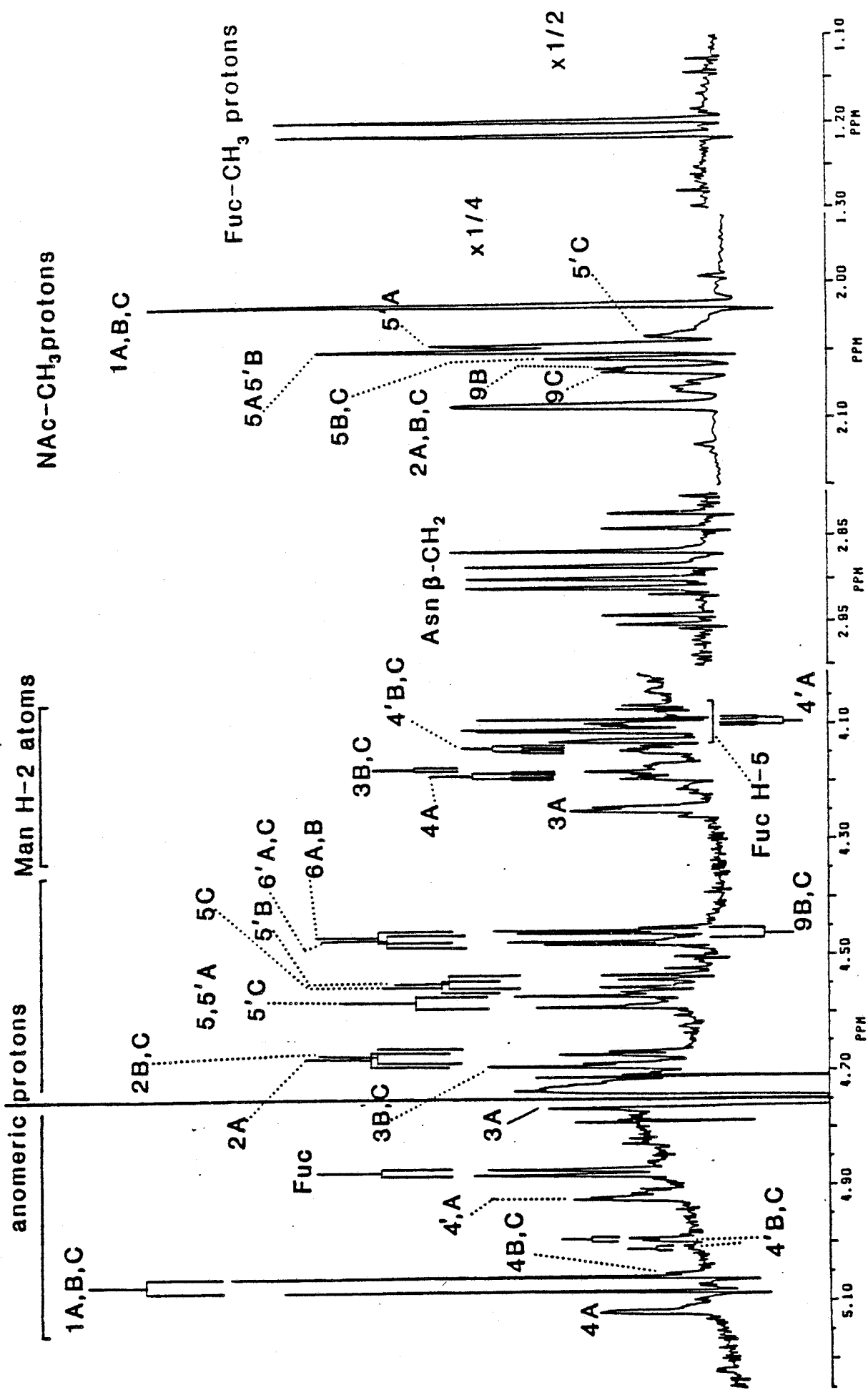
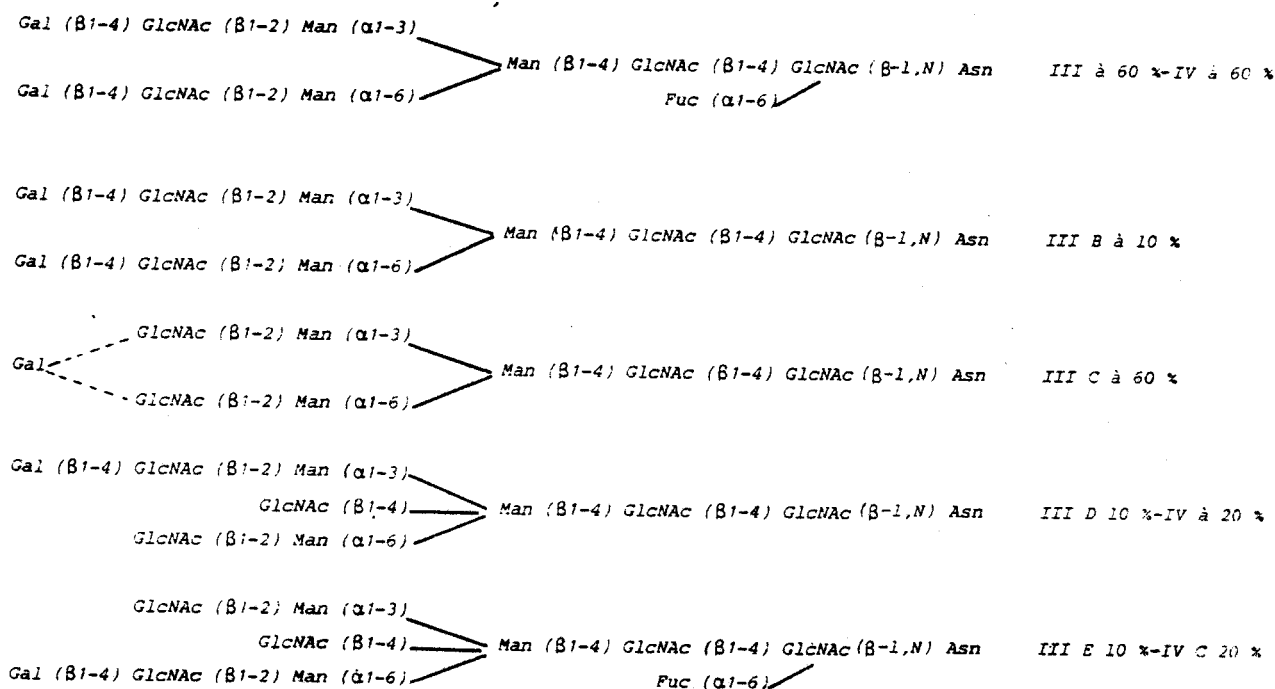


Fig. 28 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction IV

Un doublet à 4.546 correspond aux protons H-1 des *GlcNAc* 5/5' de III C, qui sont présents en proportion très faible.

La fraction IV ne renferme pas les glyco-asparagines III B et III C.

Ci-après, se trouvent les structures des glyco-asparagines III et IV, déterminées sur la base de l'étude du spectre R.M.N. à 400 MHz.



Le spectre R.M.N. du glyco-asparagine V (Fig.29, p.74) est significatif d'un mélange de plusieurs isomères comme le montrent les doublets du signal H-1 de Man 4 et 4'. Les signaux H-1 de Man 4 et 4' sont trouvés à la même position que celle définie précédemment pour les composés III A et IV A.

La liaison du fucose en (α1-6) sur *GlcNAc*-1 est révélée par les déplacements chimiques identiques à ceux trouvés ci-dessus pour les autres glyco-asparagines. Les Gal-6 et 6' sont présents. Les valeurs des déplacements chimiques δ des signaux des protons H-2 de Man-4 et 4' indiquent que les résidus sont soit substitués par un résidu de N-acétyllactosamine, soit en position terminale non réductrice,

Les signaux H-1 de *GlcNAc*-5 et 5' résonnent à peu près à la même valeur caractéristique qu'une N-acétylglucosamine substituée en (β1-4) par un résidu de galactose.

La valeur δ à 4.546 correspond à un résidu *GlcNAc* non substitué, 5 et/ou 5'. Cette observation montre la présence d'un troisième isomère de type bi-antenné à N-acétylglucosamines en position terminale non réductrice.

Au vu de ces résultats, les glyco-asparagines de la fraction V possèdent les structures suivantes (p. 75).

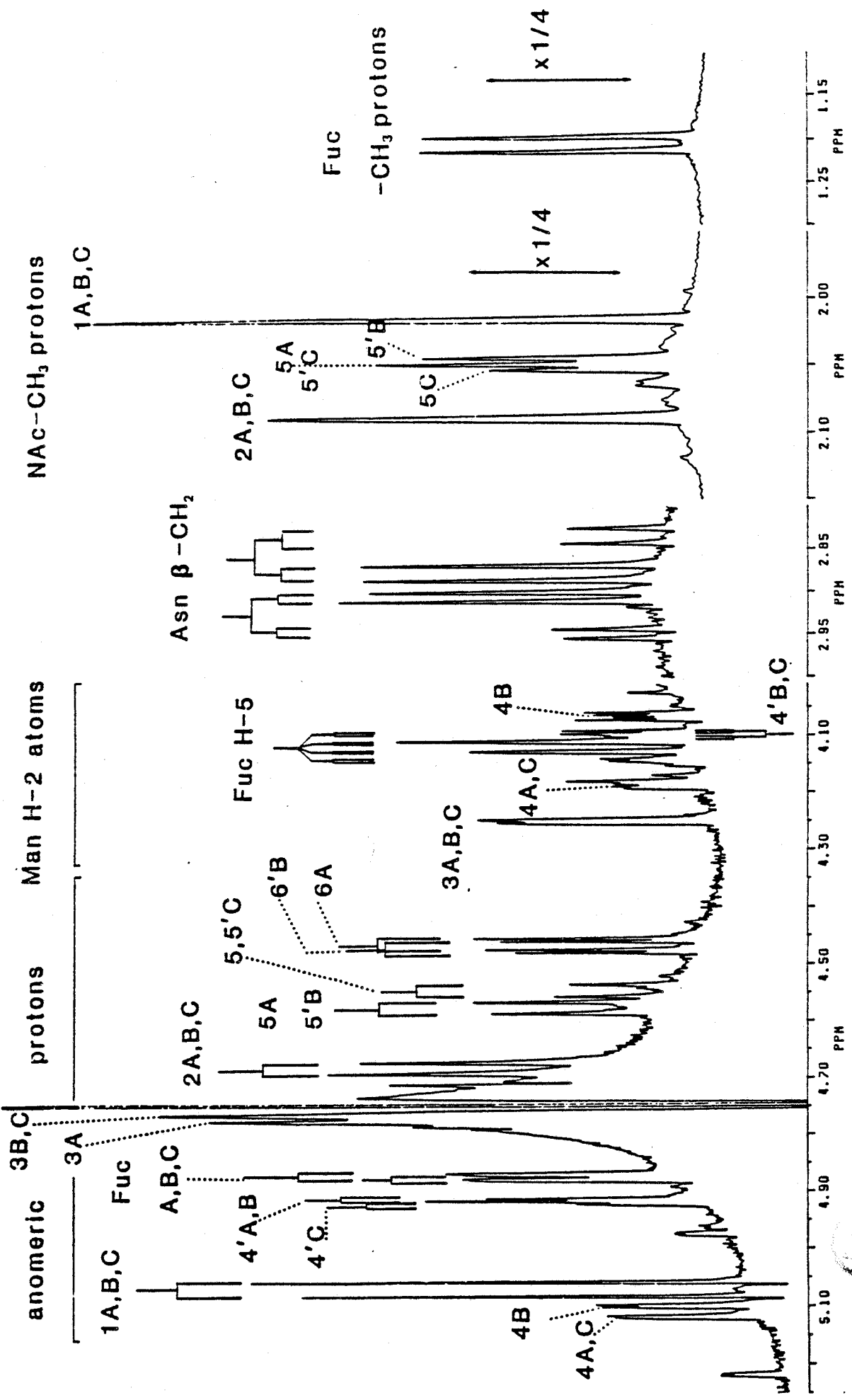
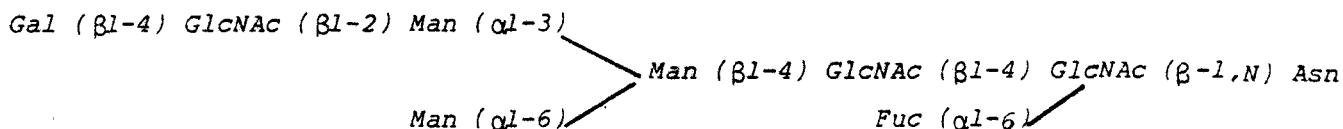
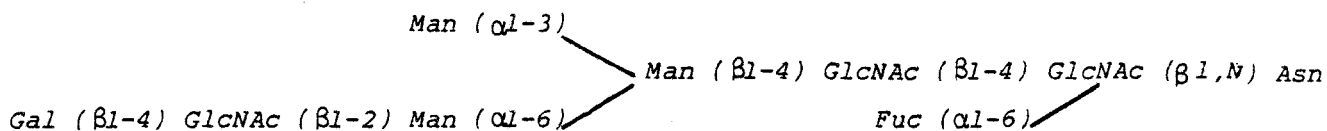


Fig. 29 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction V

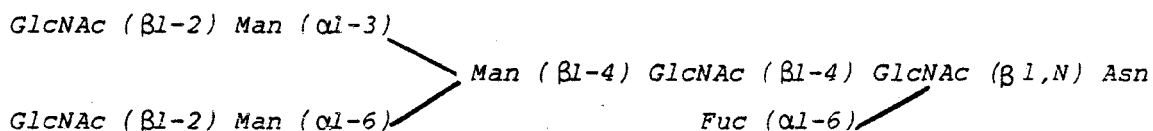
V A (40 %)



V B (40 %)



V C (20 %)



Les valeurs des différents glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire de V A et V B ont été établies par comparaison avec les valeurs obtenues pour deux oligosaccharides similaires isolés de l'urine d'un patient atteint du syndrome de Morquio type B [MICHALSKI *et al.* (149)]. Dans ce cas, les deux isomères étaient dans les proportions 1:3, ce qui avait permis d'observer que le signal H-1 de Man-4 était déplacé vers un champ plus élevé en absence de substitution en C-2. Sur la base de cette observation, les résonances des protons H-1 des Man-4 de V A et V B sont assignées à $\delta 5.119$ et $\delta 5.099$ respectivement.

Le fait le plus notable dans le spectre R.M.N. du composé VI (Fig. 30, p. 76) est la présence de signaux H-1 intenses dus aux protons de Man-4 et Gal-6. La liaison du fucose en ($\alpha 1-6$) sur la GlcNAc-1 est déduite par les déplacements chimiques caractéristiques cités ci-dessus. Les signaux représentatifs de GlcNAc-9 sont observés mais leur intensité est très faible. Les signaux correspondant à H-2 de Man-3 et 4 du glyco-asparagine VIB ne sont pas identifiés, certainement inclus dans le bruit de fond.

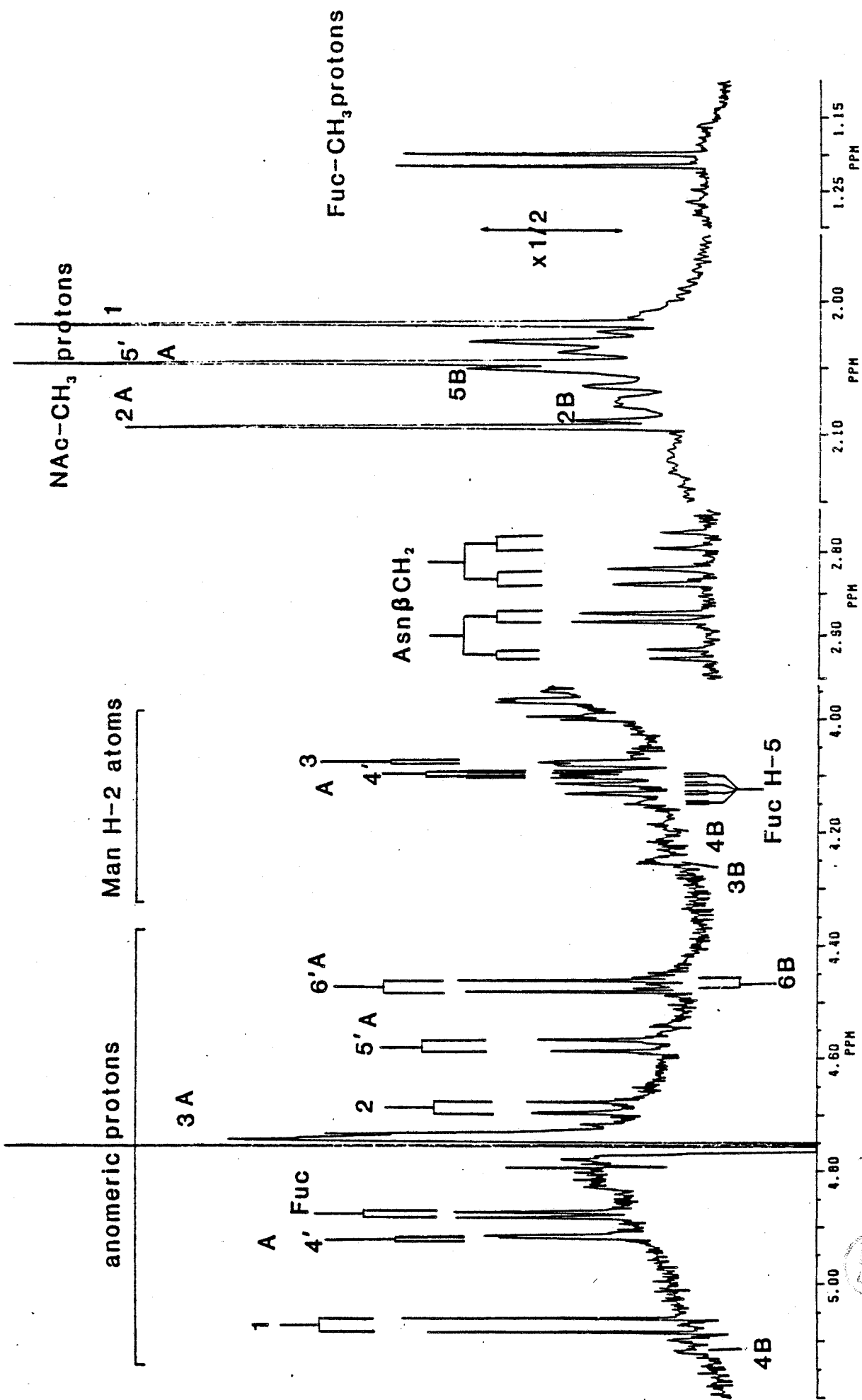
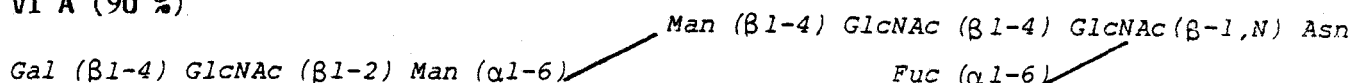


Fig. 30 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction VI

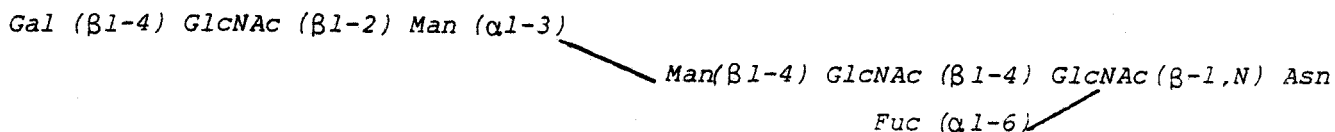


De par les résultats, les structures des glyco-asparagines présents dans la fraction VI sont :

VI A (90 %)



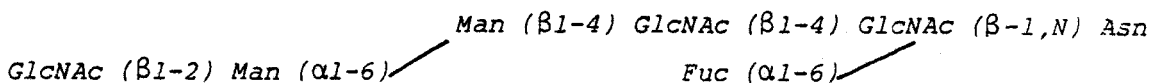
VI B (10 %)



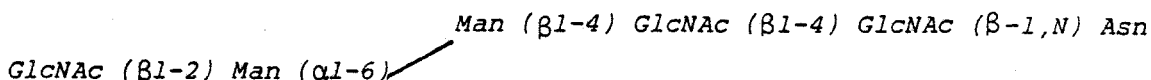
Le spectre de la fraction VII (Fig. 31, p. 78) montre trois signaux correspondant aux groupements acétamido à $\delta 2.016$ (GlcNAc-1), $\delta 2.090$ (GlcNAc-2 d'une structure où GlcNAc-1 est substitué en $(\alpha 1-6)$ par un résidu de Fucose) et $\delta 2.050$ (GlcNAc-5'). Un quatrième singulet de plus faible intensité à $\delta 2.070$ indique la présence d'un afucoglyco-asparagine.

Les signaux des Man-4, Gal-6/6' sont manquants et le proton H-1 de Man-4' résonne à $\delta 4.910$. Les résultats montrent sans équivoque que la fraction VII contient les deux glyco-asparagines suivants :

VII A (75 %)

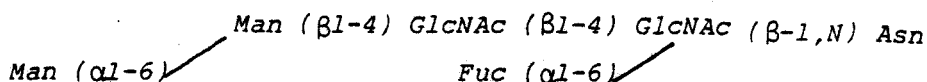


VII B (25 %)



L'interprétation du spectre R.M.N. de la fraction VIII (Fig. 32, p. 79) révèle uniquement la présence de Fucose, des Mannoses 3 et 4' et des N-acétylglucosamines 1 et 2. La structure du glyco-asparagine VIII est établie comme étant :

VIII



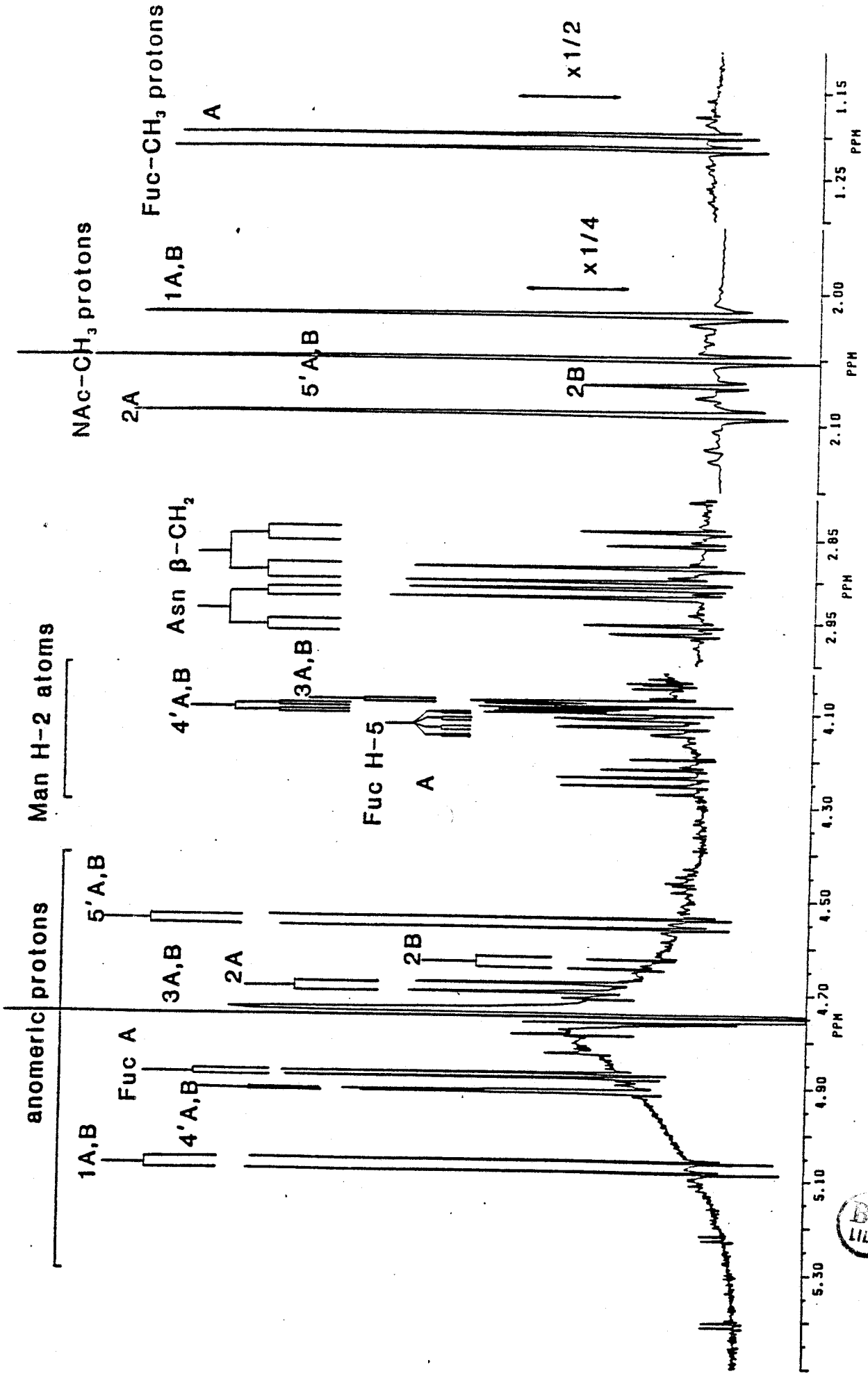


Fig. 31 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction VII



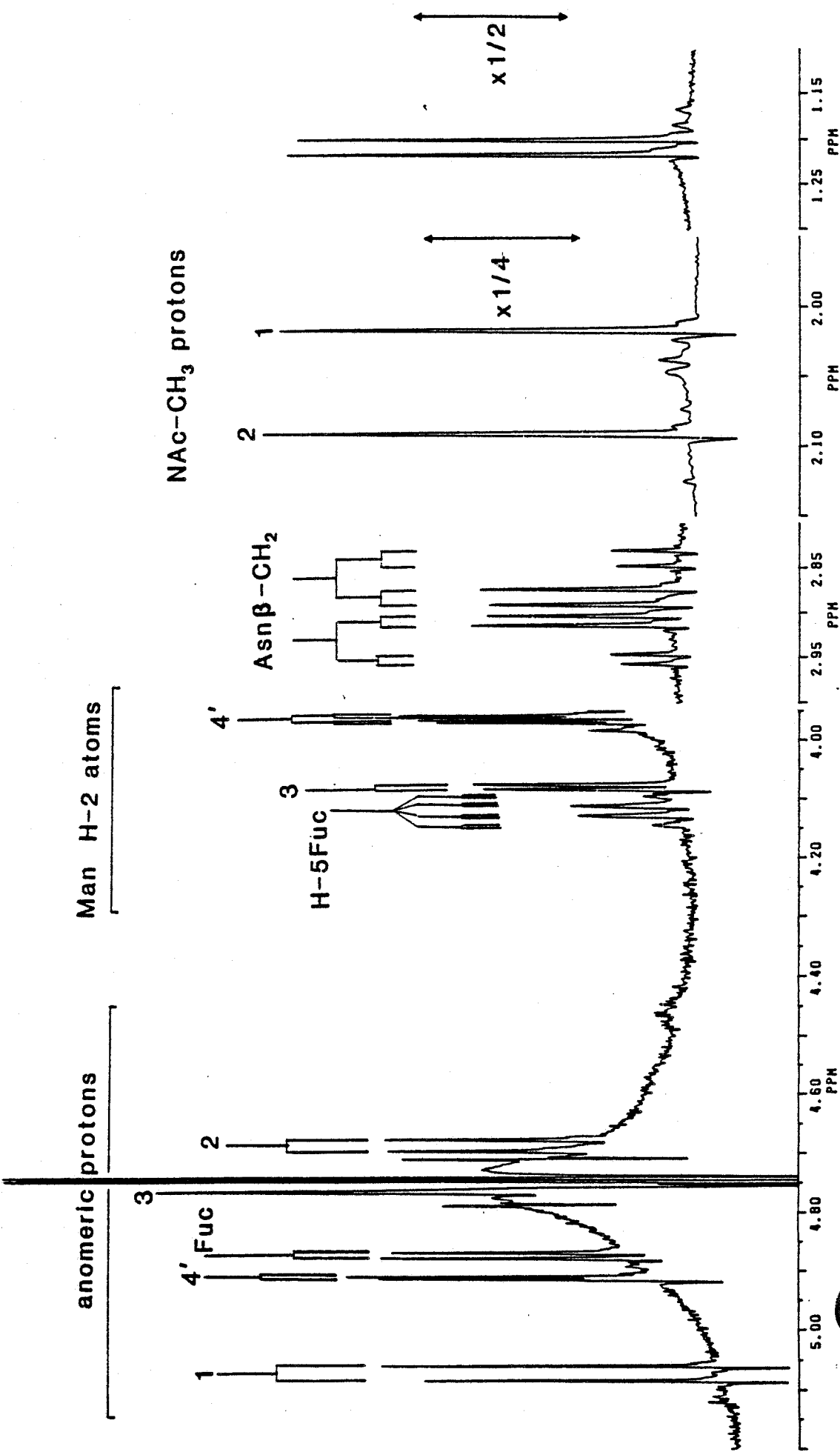


Fig. 32 :
 Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz
 de la fraction VIII

III. DISCUSSION

Les glyco-asparagines neutres ainsi déterminés représentent moins de 10 % du matériel glycopeptidique présent dans le méconium. La détermination de la structure complète n'a été possible que par l'utilisation de la R.M.N.¹H à haute résolution. La séquence glycanique, le type ainsi que l'anomérisation des liaisons entre les différents monosaccharides ont ainsi pu être établis.

Nous pouvons penser que les glyco-asparagines décrits dans cette étude dérivent du catabolisme des N-glycosylprotéines. Les composés III_A et III_B représentent la forme désialylée d'une structure bi-antennée commune à un grand nombre de N-glycosylprotéines.

Il est intéressant de noter que les composés I, II_A et II_B possèdent à la fois une N-acétylglucosamine intercalaire et un résidu de fucose lié en (α1-6). Cette caractéristique fonctionnelle déjà décrite dans les IgA de sécrétion [PIERCE - CRETEL *et al.* (150)] n'est toutefois pas répandue. Un trait commun aux glyco-asparagines du méconium est la présence d'un résidu de Fucose substituant en(α1-6) le résidu de *GlcNAc-1*. Si on admet que ces structures dérivent du catabolisme des N-glycosylprotéines, on peut noter la faible activité de l'α1-6 fucosidase dans l'intestin foetal.

De plus, la présence du résidu de Fucose peut expliquer que les glyco-asparagines ne sont pas dégradés ultérieurement en oligosaccharides par l'action de l'aspartyl-glucosaminidase lysosomale ou par l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase [BAUSSANT (151)].

L'origine de ces composés implique également que les structures I à VIII sont des témoins des différentes étapes du catabolisme. Dans ce cas, on peut imaginer que la dégradation enzymatique des différentes branches des chaînes glycaniques est un phénomène ordonné. La voie de dégradation récurrente "branche après branche" est en accord avec la présence des structures limites constituées par les glyco-asparagines VI_A à VIII. Cette hypothèse est avancée au vu de l'analogie avec les oligosaccharides présents dans les urines de patients souffrant de maladies lysosomales de surcharge [STRECKER *et* MONTREUIL (152)].

Contrairement aux assertions d'HOUNSELL *et al.* (37) dans un travail antérieur, les glyco-asparagines que nous avons isolés ne font apparaître aucun des déterminants antigéniques de type "onco-foetal" décrits à ce jour. Il est possible que de tels déterminants ne soient portés que par des structures N-glycaniques plus complexes ou restreints aux structures O-glycaniques. Les études menées actuellement au laboratoire sur ce type de matériel permettra de conforter ou d'infirmier cette hypothèse.

ETUDE PAR R.M.N.-¹H A 400 MHz
 ET PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE GLYCO-ASPARAGINES
 ISOLEES D'URINE DE MALADES ATTEINTS DE FUCOSIDOSE

I. MATERIELS ET METHODES

A. MATERIEL

Les gels pour la chromatographie de tamisage moléculaire (*Biogel P2*) et les différentes résines échangeuses d'ions Dowex sont obtenues des Laboratoires Bio-Rad (*U.S.A.*). Les plaques de chromatographie couche mince sur gel de silice (*Kieselgel 60*) proviennent de la Société MERCK (*R.F.A.*).

B. PREPARATION DE LA FRACTION GLUCIDIQUE

Un litre d'urine fraîchement collecté a été déminéralisé par passage sur des colonnes couplées (4 x 40 cm) de résines échangeuses de cations (*Dowex 50 x 8, 25-50 mesh ; sous forme H⁺*) puis d'anions (*Dowex 1 x 8, 200-400 mesh, sous forme HCO₂⁻*).

C. FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1. Chromatographie d'échange d'ions

Après déminéralisation, la solution contenant le matériel glucidique est passée sur une colonne (4,5 x 50 cm) de Dowex 50 x 2, 200-400 mesh, sous forme H⁺. Après lavage par 1 litre d'eau distillée, la désorption est effectuée par un tampon acétate de pyridine (pH 5,5) de molarité 20 mM.

La fraction glycopeptidique, obtenue après chromatographie d'échange d'ions, est dessalée par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de biogel P₂ (2 x 50 cm) avec de l'eau désionisée comme éluant.

2. Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.)

La fraction glycopeptidique est ensuite séparée par chromatographie haute pression.

a. Technique utilisée

1 mg d'échantillon, dissous dans 100 μ l d'une solution d'acétonitrile eau (60:40) et clarifié par filtration (filtre 0,45 μ m, Millipore) est analysé par C.L.H.P. sur une colonne Micropak AX-10, diamètre des billes de silice greffée : 10 μ m (0,4 x 30 cm, Varian).

L'appareillage utilisé est le même que celui décrit à la p. 59. La détection des molécules est effectuée à 206 nm avec un détecteur U.V. réglé à une sensibilité de 0,8, l'intégrateur étant réglé à la sensibilité 8.

Le débit de l'éluant est de 2 ml/mn. La pression maximale est fixée à 200 bars. Le gradient utilisé est le suivant :

Temps (mn)	0	20	35	50	100	110	120
% CH ₃ CN	75	70	60	55	55	40	30
% H ₂ O	25	30	40	45	45	60	70

b. Résultats

La Fig. 33 p.83 illustre le résultat de la Chromatographie Liquide Haute Pression. Nous observons 16 pics de fucosides notés de I à XVI.

3. Analyse par Chromatographie couche mince (C.C.M.)

Les pics détectés à 206 nm sont chromatographiés sur couche mince (silicagel 60, Merck) dans le système solvant éthanol-n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (100 : 10 : 10 : 3 : 30 vol/vol). Les plaques sont révélées par le réactif au naphtorésorcinol (0,1 g de naphtorésorcinol ; 19 ml d'éthanol absolu ; 1 ml d'acide sulfurique). Le profil chromatographique sur couche mince est représenté à la Fig. 34, p.84.

% d'acétonitrile dans la phase mobile

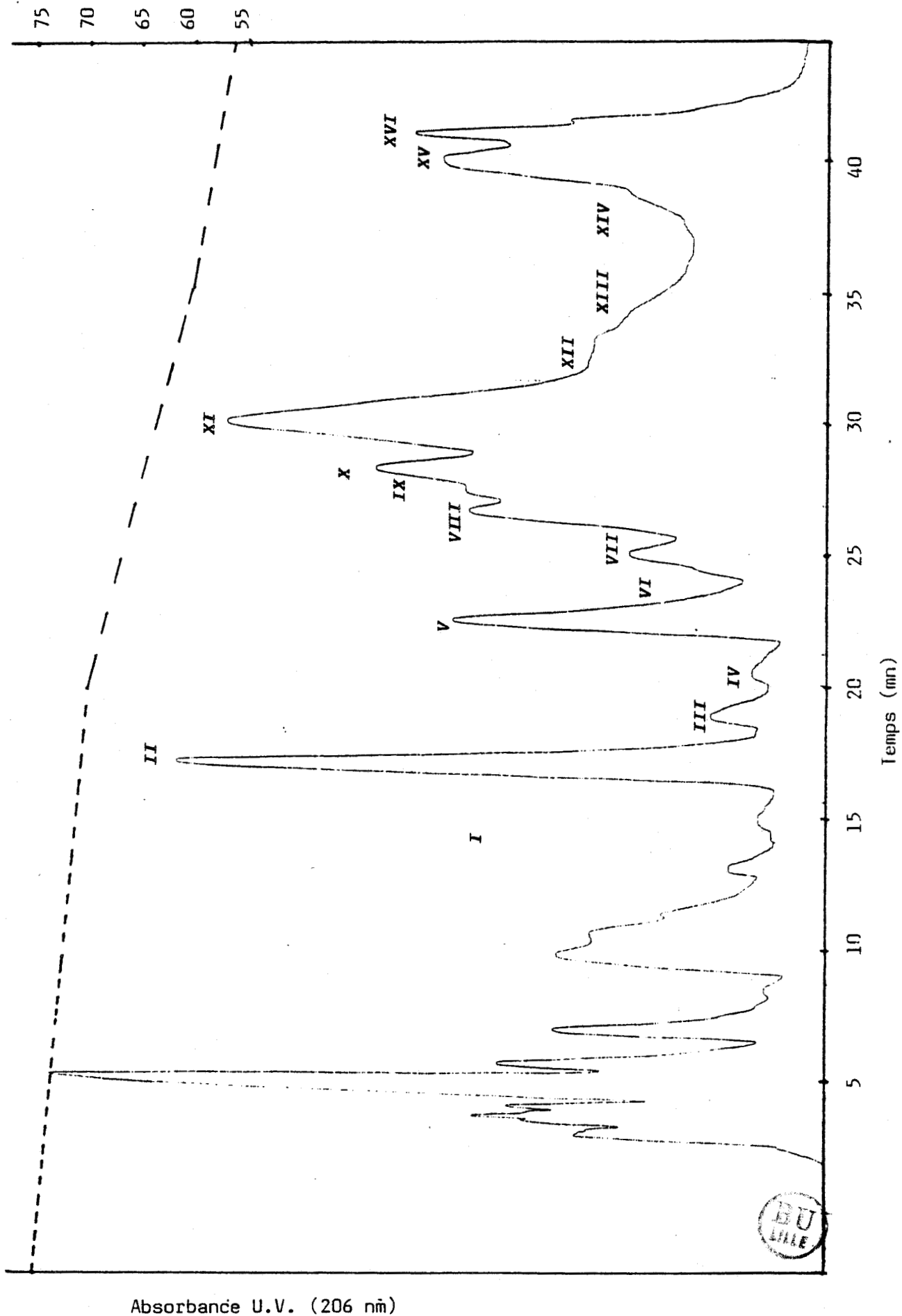


Fig. 33 : Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.) sur colonne AX-10 des glyco-asparagines isolés d'urine de fucosidose

Fig. 33 :

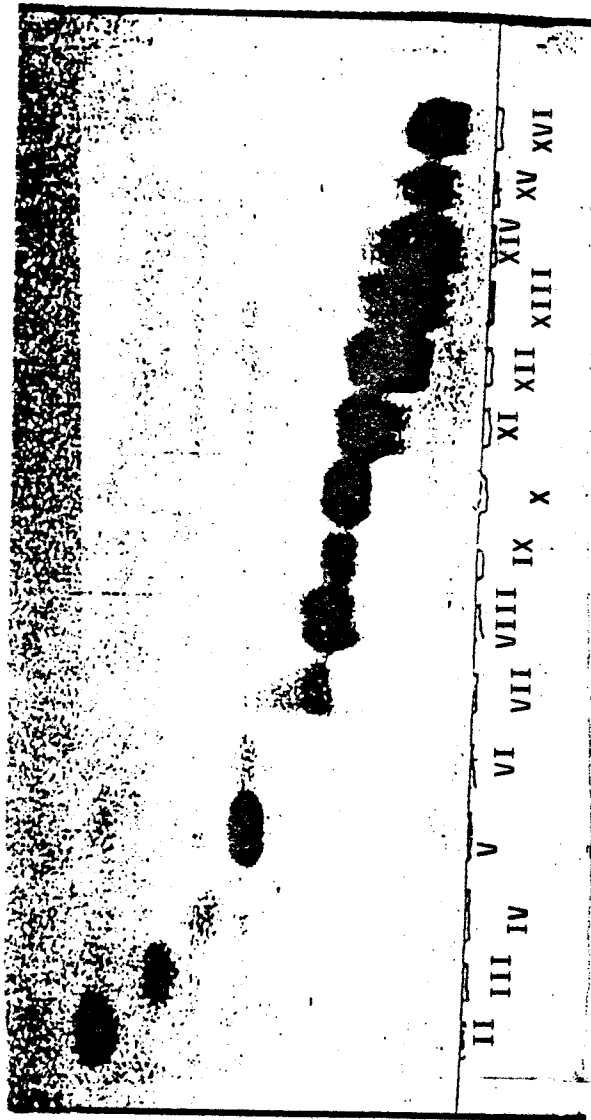


Fig. 34 :

Profil chromatographique (C.C.M.) des glyco-asparagines isolés d'urine de fucosidose

4. Chromatographie Liquide Haute Pression de phase inverse

a. Principe

Le principe de la séparation des différents composés est fondé sur l'hydrophobie plus ou moins grande des molécules, les molécules hydrophobes étant retenues par la phase stationnaire composée de chaîne aliphatique C_{18} . Dans notre cas, les fucosides à poids moléculaire supérieur étant plus hydrophiles sont exclus de la colonne alors que les fucosides de poids moléculaire plus faible sont légèrement retardés. La phase mobile est constituée de 100 % d'eau.

b. Technique utilisée

Les fractions de fucosides VI, VII, VIII et IX séparées par C.L.H.P. sur colonne micropak AX10 sont assemblées et chromatographiées à nouveau par C.L.H.P. de phase inverse.

1 mg d'échantillon dissous dans 100 μ l d'eau et clarifié par filtration (*filtre 0,45 μ , Millipore*) est analysé sur une colonne ultrasphère O.D.S., diamètre des billes de silice greffée de C_{18} : 5 μ m (0,46 x 25 cm, Beckman, U.S.A.).

Pour cela, nous disposons du matériel décrit p. 59. La détection U.V. s'effectue à 206 nm avec un détecteur réglé à la sensibilité 0,16, l'intégrateur étant réglé à la sensibilité 32. Le débit de l'éluant est de 1 ml/mn. La pression maximale est fixée à 200 bars.

Le gradient utilisé est le suivant :

Temps (en mn)	0	30	37	45
% H ₂ O	100	100	90	50
% CH ₃ CN	0	0	10	50

c. Résultats

Le profil chromatographique (Fig. 35, p. 86) révèle 18 nouvelles fractions notées GP 1 à GP 18.

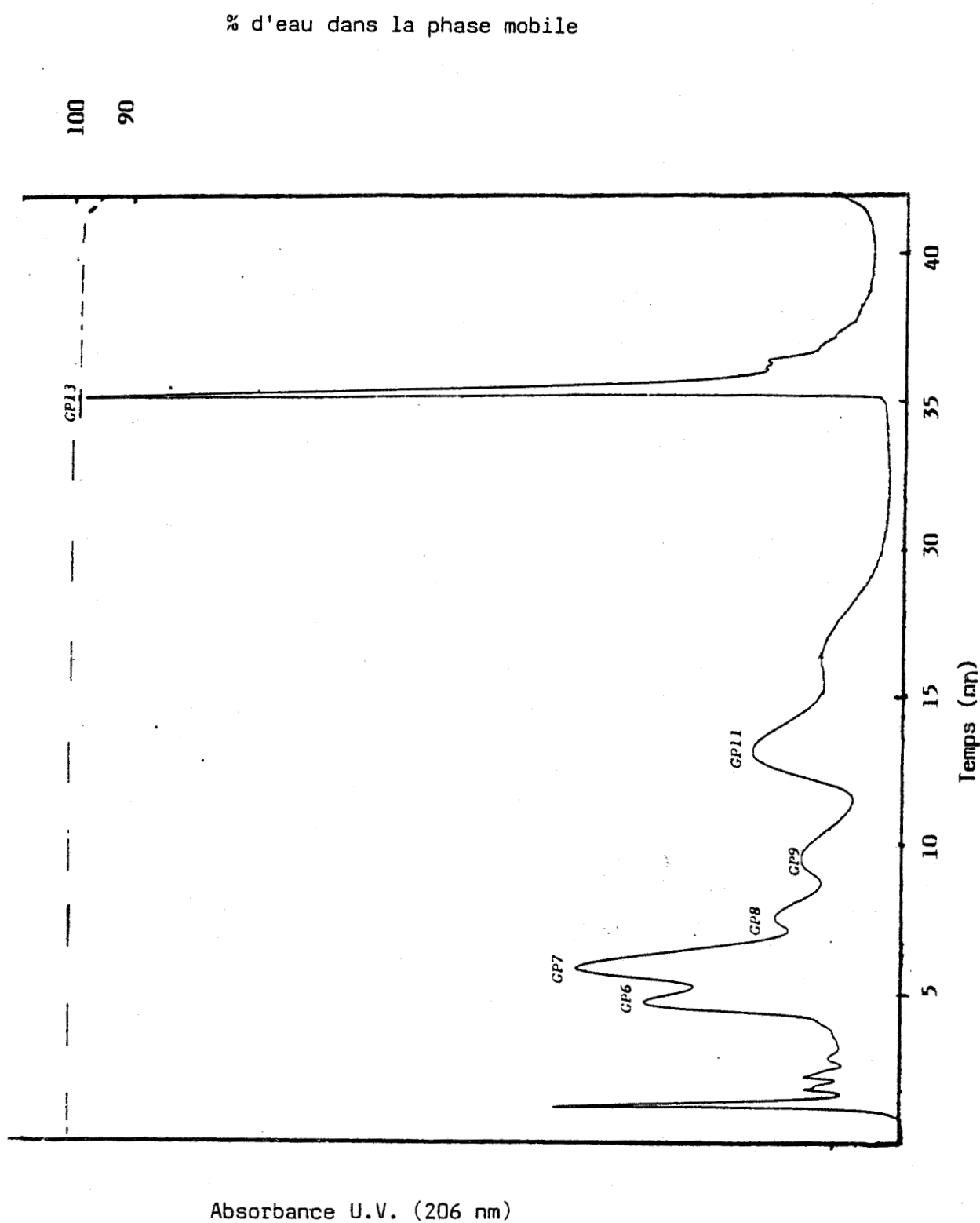


Fig. 35 :

Chromatographie Liquide Haute Pression de phase inverse du mélange des fractions VI, VII, VIII et IX

D. ETUDE DES GLYCO-ASPARAGINES

1. Etude par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (R.M.N.-¹H) à 400 MHz des glyco-asparagines II à XVI

Le matériel utilisé ainsi que le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits à la p. 62.

2. Perméthylation des glyco-asparagines GP 6 à GP 9, GP 11 et GP 13

Les glyco-asparagines sont perméthylés suivant la méthode de FINNE *et al.* (153), améliorée par PAZ PARENTE *et al.* (154), en utilisant comme agent méthylant CH₃I. Les composés perméthylés, méthanolysés (MeOH anhydre /HCl 0,5M, 24 heures, 80 °C) et péracétylés sont analysés en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. [FOURNET *et al.* (155)]. (Spectromètre de masse RIBER MAG, modèle 10-10 RUEIL MALMAISON, France). La séparation est réalisée sur une colonne capillaire CPSil 5 CB ; 0,3 mm x 50 m ; injecteur ROSS ; gaz vecteur : hélium (25 ml/mn) 0,05 bar en tête de colonne ; programmation de température de 100 à 240 °C à raison de 5 °C par minute ; température de l'injecteur et de l'interface : 240 °C ; énergie d'ionisation 70 eV. Les spectres de masse ont été obtenus en impact électronique (E.I.).

II. RESULTATS

A. ETUDE PAR R.M.N.-¹H A 400 MHz DES FRACTIONS II à XVI

1. Fraction II

Les signaux caractéristiques des protons anomériques de *GlcNAc-1* à δ 5.099 et de *Fuc* (α 1-6) à δ 4.901 permettent d'identifier le fucoside *Fuc* (α 1-6) *GlcNAc* (β 1,N) *Asn*, dont les paramètres de R.M.N. (Tableau IX, p 107 et Fig. 36, p. 88) sont en tous points identiques à ceux décrits précédemment par DORLAND *et al.* (156) .

2. Fraction III

Les paramètres décrits dans le Tableau IX, p. 107 et la Fig.37, p. 89 permettent également d'identifier aisément le fucoside III au glyco-asparagine *Gal* (β 1-4) [*Fuc* (α 1-6)] *GlcNAc* (β 1,N) *Asn* précédemment isolé de l'urine de fucosidose [VLIEGENTHART *et al.* (147)].

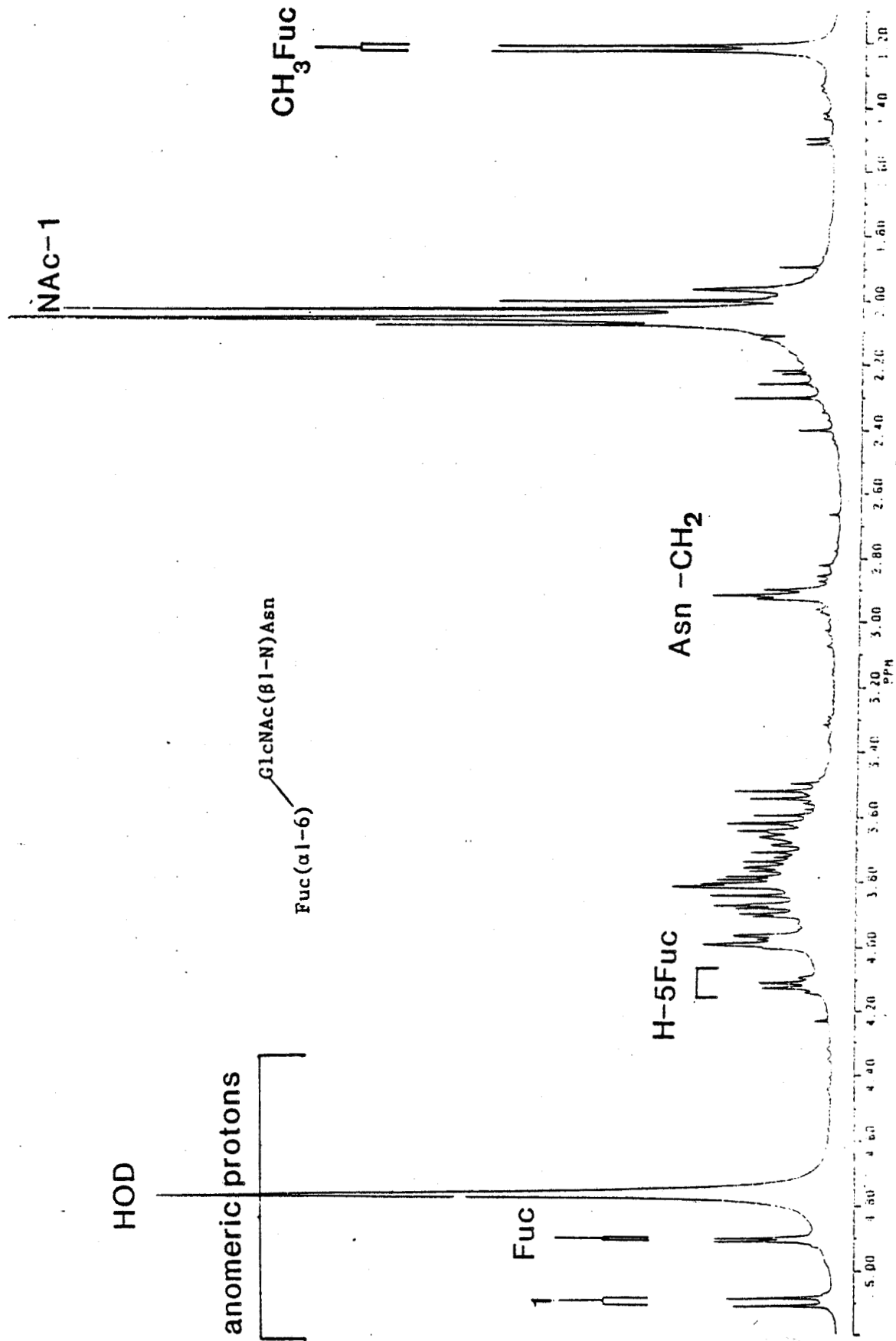


Fig. 36 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction II

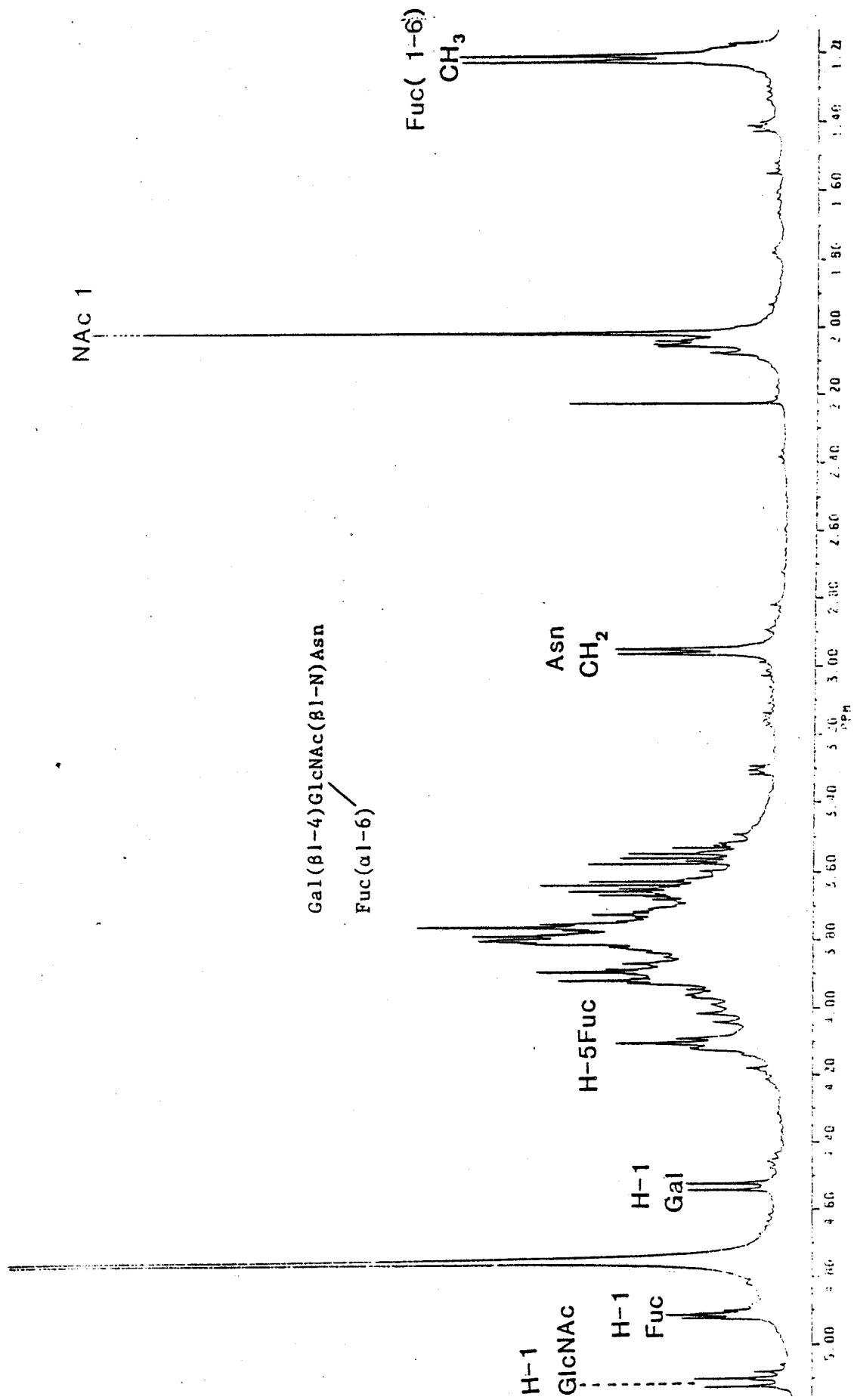


Fig. 37 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction III

3. Fraction IV

L'extrême complexité du spectre R.M.N. du fucoside IV ne nous permet pas de caractériser tous les constituants présents dans cette fraction. L'analyse des signaux de protons anomériques ne permet pas de mettre en évidence de mannose en quantité appréciable. En revanche, nous observons trois doublets à $\delta 4.443$, $\delta 4.450$ et $\delta 4.467$ relatifs aux protons anomériques du galactose et pas moins de six doublets provenant de six résidus de N-acétylglucosamine différents. En particulier, à $\delta 4.670$, nous notons le doublet caractéristique du proton anomérique de *GlcNAc-2* d'une séquence afuco-N-acétylchitobiose (Fig. 38, p.91).

Trois doublets dus au groupement méthyl du fucose sont également observés à $\delta 1.175$ (*Fuc* ($\alpha 1-3$)), $\delta 1.207$ (*Fuc* ($\alpha 1-6$)) et $\delta 1.214$ (valeur proche de celle observée pour *Fuc* ($\alpha 1-2$)). La nature de cette dernière liaison est rendue probable par la présence du doublet à $\delta 5.308$ relatif au proton anomérique du fucose ($\alpha 1-2$).

Les signaux à $\delta 2.017$ (acétamido) et à $\delta 1.214$ peuvent témoigner de la contamination par le fucoside III décrit plus haut.

Le comportement chromatographique de la fraction IV confirme que le nombre d'unités monosaccharidiques est compris entre 3 et 5.

La faible quantité de mannose et la multiplicité des signaux du galactose et de la N-acétylglucosamine permet donc de poser en hypothèse que la fraction IV renferme de nombreuses structures construites selon le modèle général *Gal* ($\beta 1-3/4$) *GlcNAc* ($\beta 1-3/4$) *Gal* ($\beta 1-4$) *GlcNAc* ($\beta 1, N$) *Asn* substitué par du fucose en divers points de branchement. L'isolement de chacun de ces fucosides nécessitera la mise au point de méthodes chromatographiques particulières.

4. Fraction V

Nous ne commenterons pas l'analyse du spectre du fucoside V, dont la structure *Man* ($\alpha 1-6$) *Man* ($\beta 1-4$) *GlcNAc* [*Fuc* ($\alpha 1-6$)] *GlcNAc* ($\beta 1-N$) *Asn* a été précédemment décrite [STRECKER *et al.* (157)]. Les différents paramètres sont rapportés dans le Tableau IX, p.107 et Fig. 39, p. 92

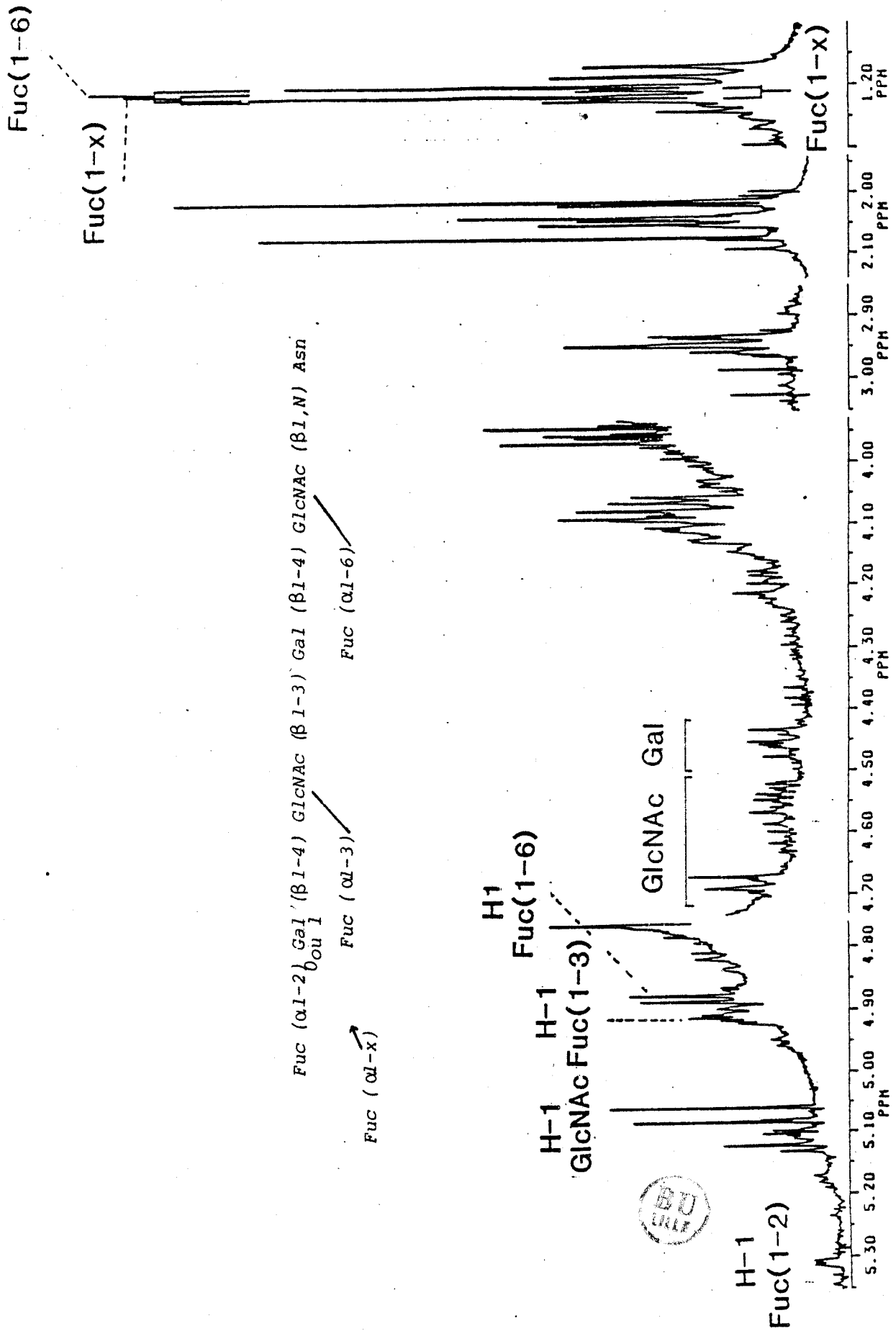


Fig. 38 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction IV

Fig. 38 :

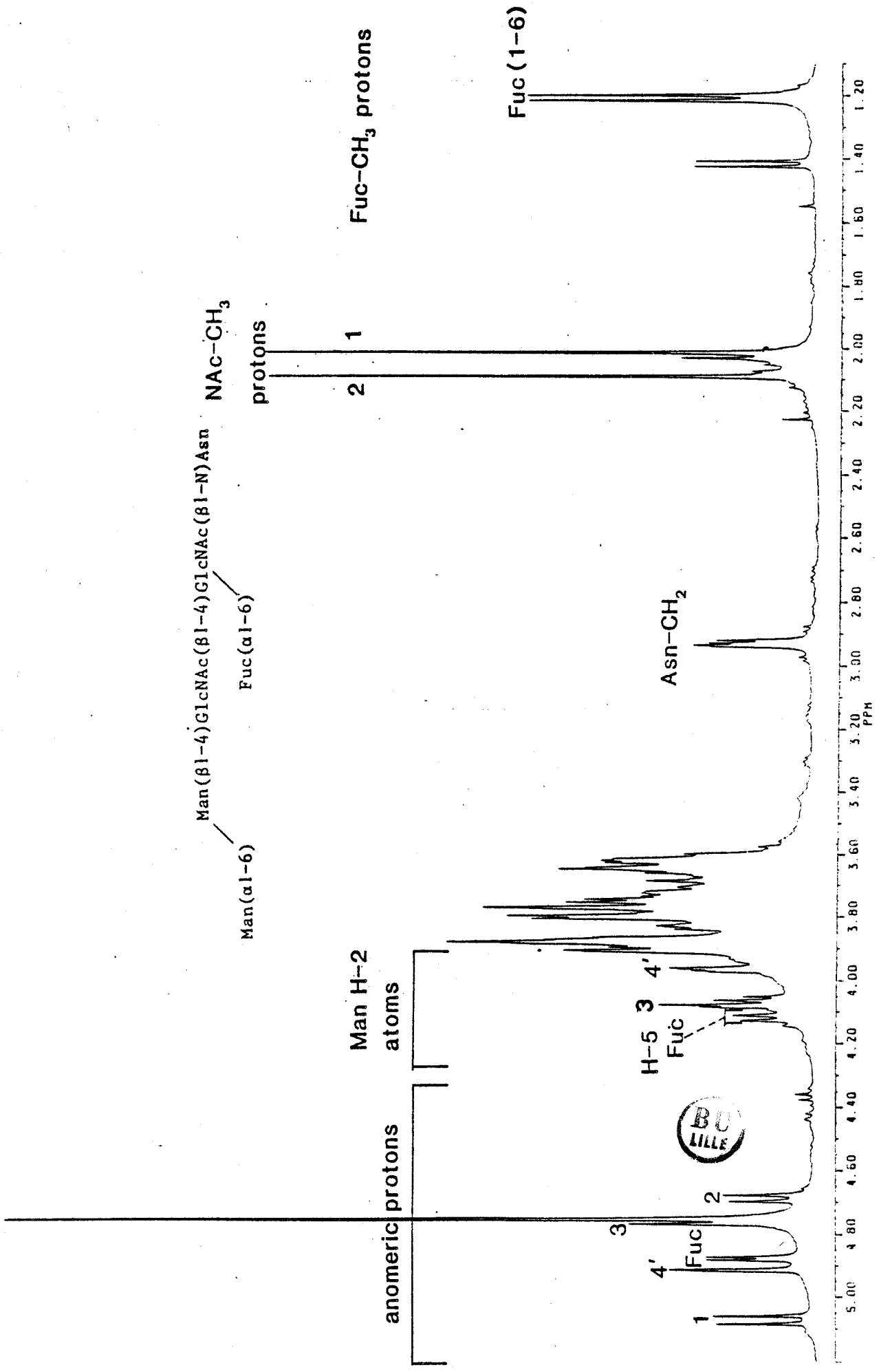


Fig. 39 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction V

5. Fractions VI, VII, VIII et IX

Les spectres R.M.N. des fractions VI, VII, VIII et IX sont donnés à la Fig. 40, p. 94, Fig. 41, p. 95, Fig. 42, p. 96, Fig. 43, p. 97 respectivement.

a. Fraction VI

Le pic du fucoside VI correspond à un épaulement mineur de la fraction V et une analyse sommaire du spectre permet de constater que la structure V constitue le composé majeur du mélange.

Les éléments nouveaux du spectre sont représentés par la présence du proton H-1 de Man-4 à $\delta 5.019$, de H-1 de GlcNAc-2 relatif à la séquence N-acétylchitobiose non fucosylée.

La principale caractéristique du spectre de la fraction VI est de posséder les signaux d'un nouveau type de liaison fucosyl, à $\delta 1.158$ (*groupement méthyl*) et $\delta 5.003$ (*proton anomérique*). Ces paramètres sont également présents dans le spectre des fucosides VII et VIII dans lesquels nous observons un dédoublement des signaux relatifs à ce nouveau fucose ($\delta 5.003$ et $\delta 5.013$ pour H-1 et $\delta 1.158$ et $\delta 1.162$ pour CH_3).

b. Fraction VII

L'analyse de la fraction VII (Fig. 41, p. 95) permet de reconnaître les différents signaux relatifs à Man-3, 4, 4' GlcNAc-1, 2, 5, 5' et Gal 6 ou 6'. Le dédoublement du proton H-2 de Man-3 montre que les glyco-asparagines de la fraction VII ne possèdent que l'une des branches supérieure ou inférieure. Le fait le plus marquant est la présence de signaux relatifs à un nouveau type de liaison fucosyl (δH_1 à 5.003 et 5.008 ; $\delta H-5$ à $\delta 1.162$ et 1.158).

A $\delta 4.446$, nous notons le signal caractéristique de H-1 de Gal-6 non substitué. A $\delta 4.584$ correspond le proton anomérique de GlcNAc-5 ou 5' engagé au sein de la séquence Fuc ($\alpha 1-2$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc -, mais les signaux $\frac{6}{6'}$ et $\frac{5}{5'}$ relatifs au fucose ($\alpha 1-2$) et au galactose 6 et 6' de cette structure sont absents. Aussi, nous pouvons conclure à la présence d'une ou plusieurs structures d'un nouveau type que nous ne pouvons définir, faute de reconnaître des paramètres non décrits dans la littérature.

NAC-CH₃ protons

Fuc-CH₃ protons

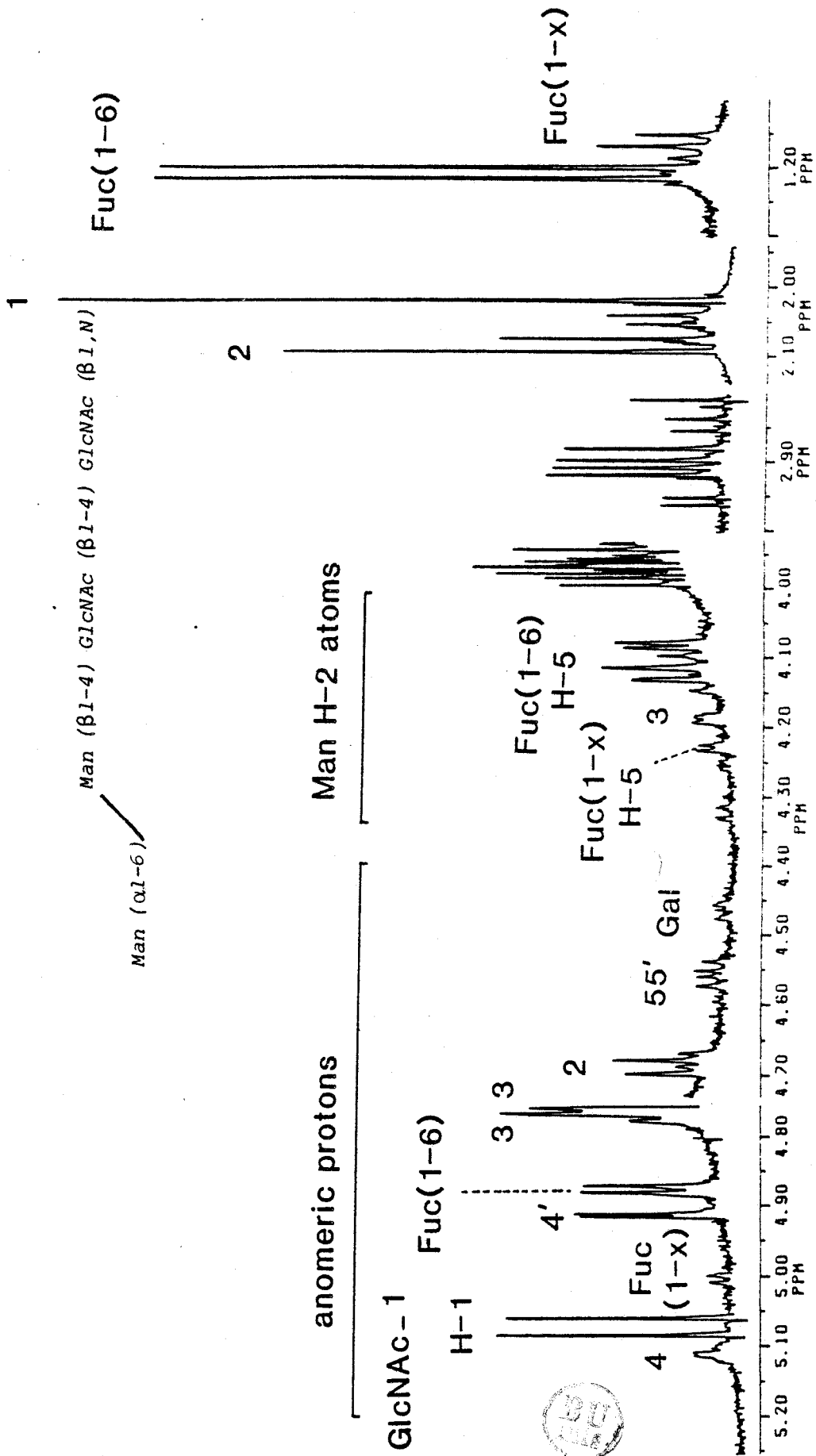


Fig. 40 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction VI

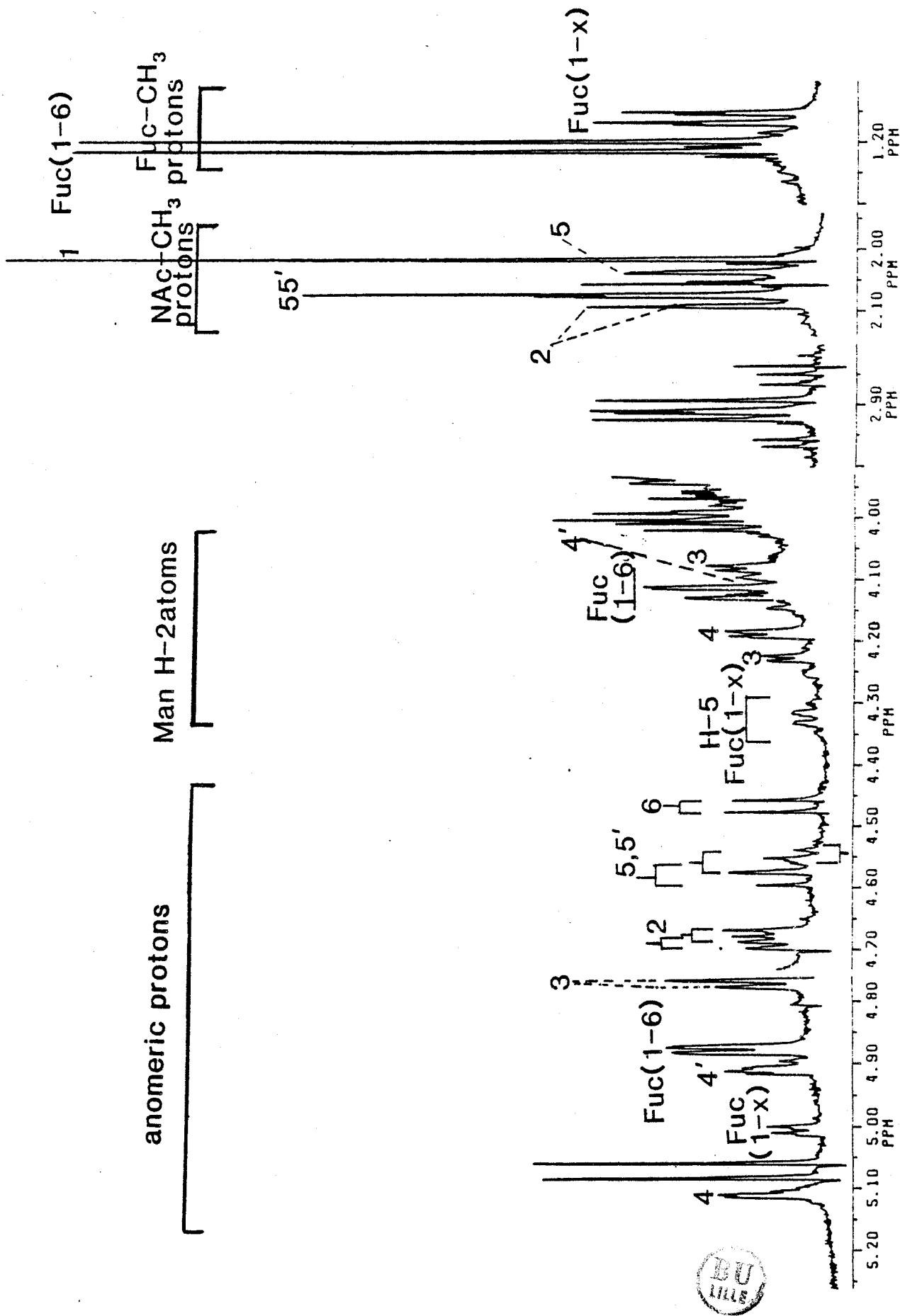


Fig. 41 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction VII

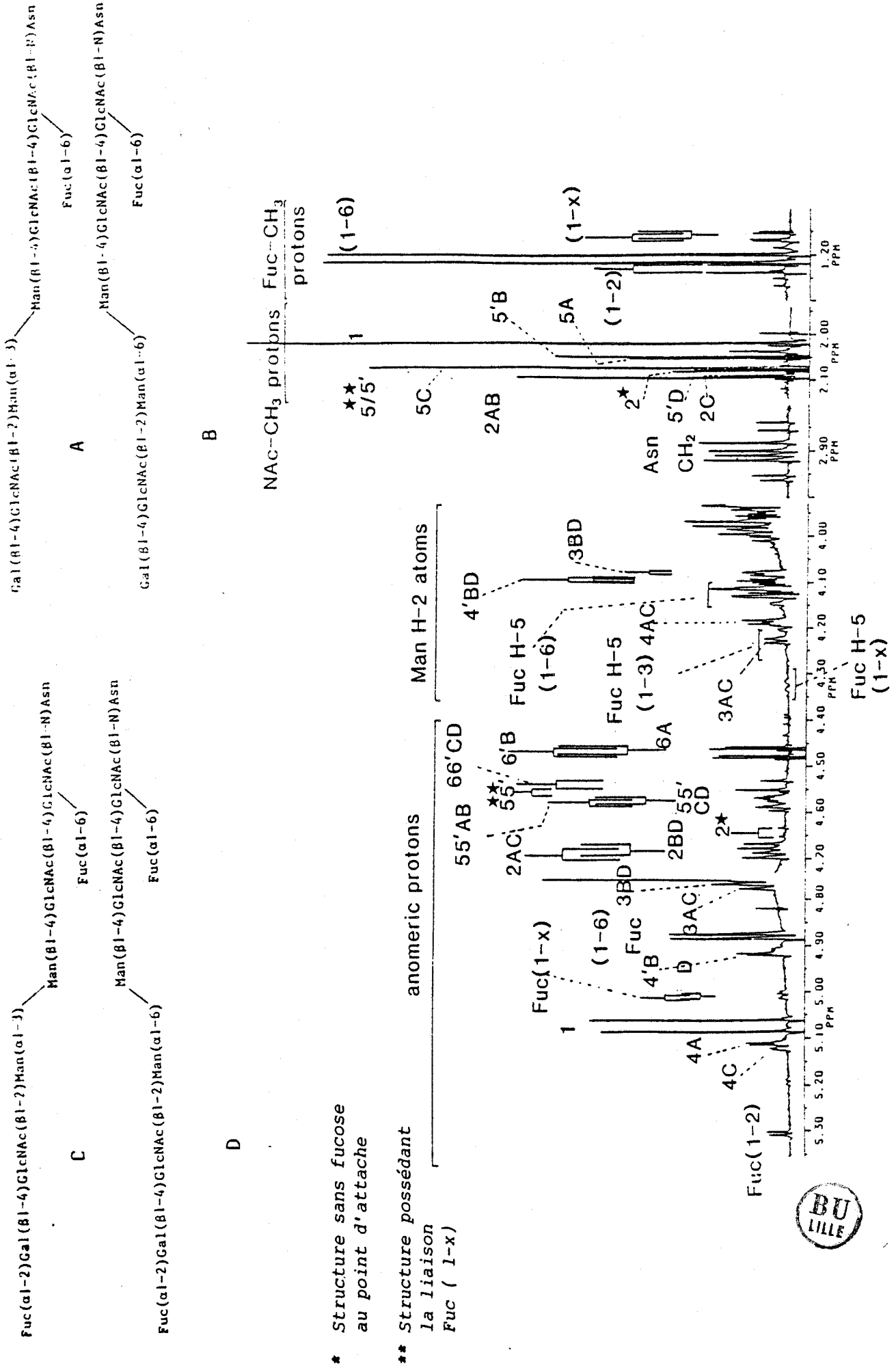
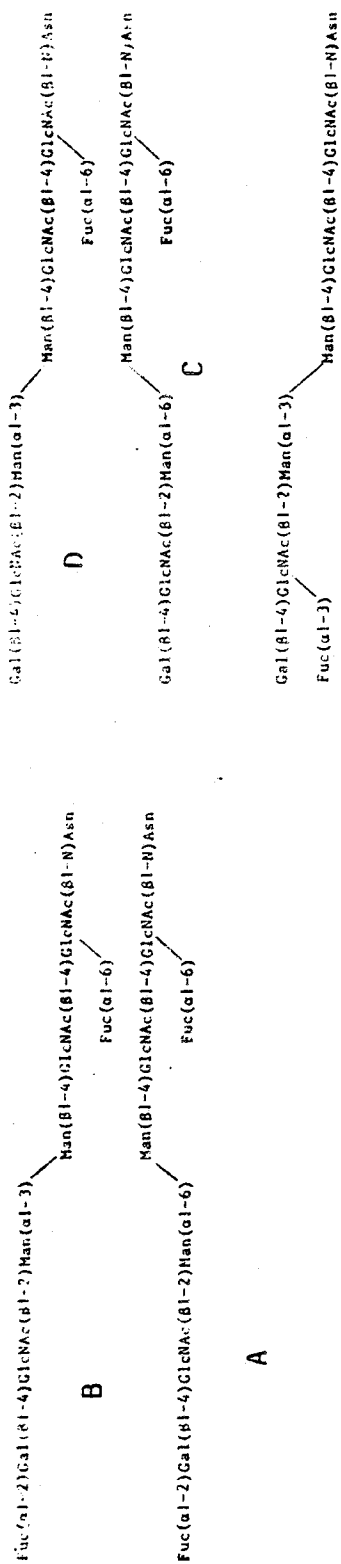


Fig. 42 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction VIII





* Structure sans fucose au point d'attache

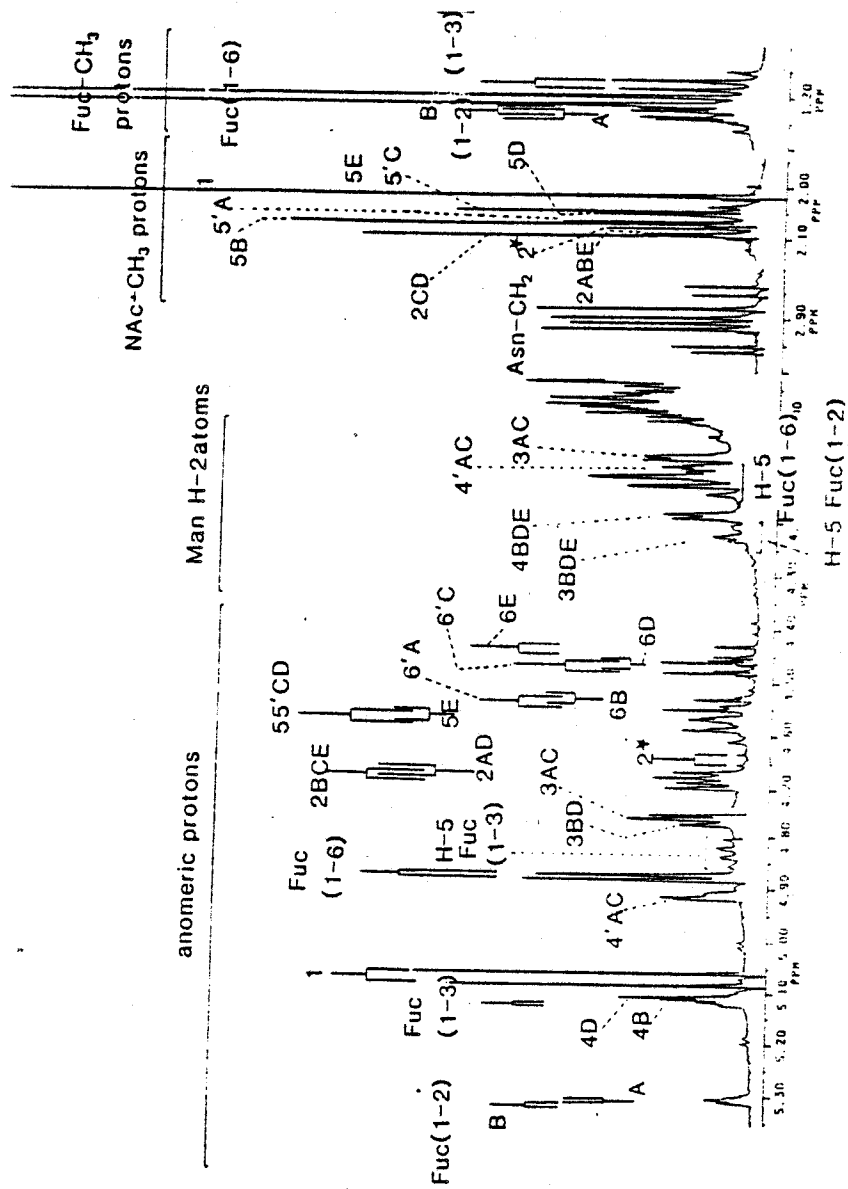
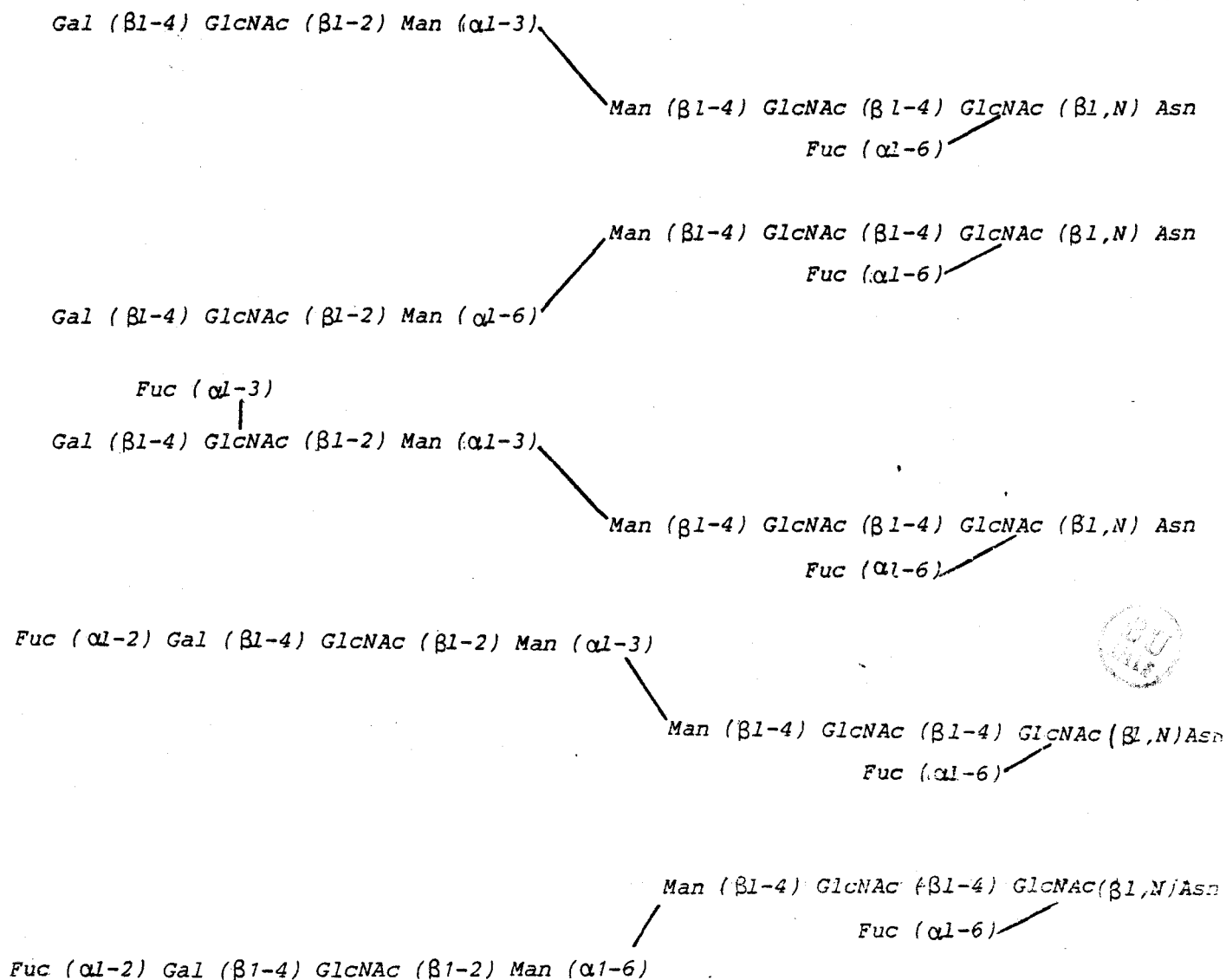


Fig. 43 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction IX



Les fractions VI à IX ont été rassemblées et analysées en C.L.H.P. sur ODS-C₁₈ dans le but de mieux séparer et définir chacun de ses constituants (voir II-B).

6. Fraction XI

Le spectre de la fraction XI renferme de nombreux doublets caractéristiques du groupement méthyl du fucose à δ 1.206 (Fuc (α 1-6)), δ 1.173 et δ 1.172 (Fuc(α 1-3)) et δ 1.234 et δ 1.232 (Fuc (α 1-2)).

Le proton anomérique de Man-4' (δ 4.905) possède une intensité supérieure à celle de Man-4 (δ 5.107), ce qui indique que les glycanes de la fraction XI possèdent essentiellement l'antenne inférieure d'une structure bi-antennée. Ce fait est confirmé par la présence de signaux à δ 4.081 (H-2 de Man-3) et δ 4.087 (H-2 de Man-4') propres à la branche inférieure et d'intensité également plus élevée que celle des signaux de H-2 de Man-3 (δ 4.228) et de H-2 de Man-4 (δ 4.187) de la branche supérieure.

Sur la base de ces données, nous pouvons attribuer aux fucosides de la fraction XI les structures reprises à la p. 101.

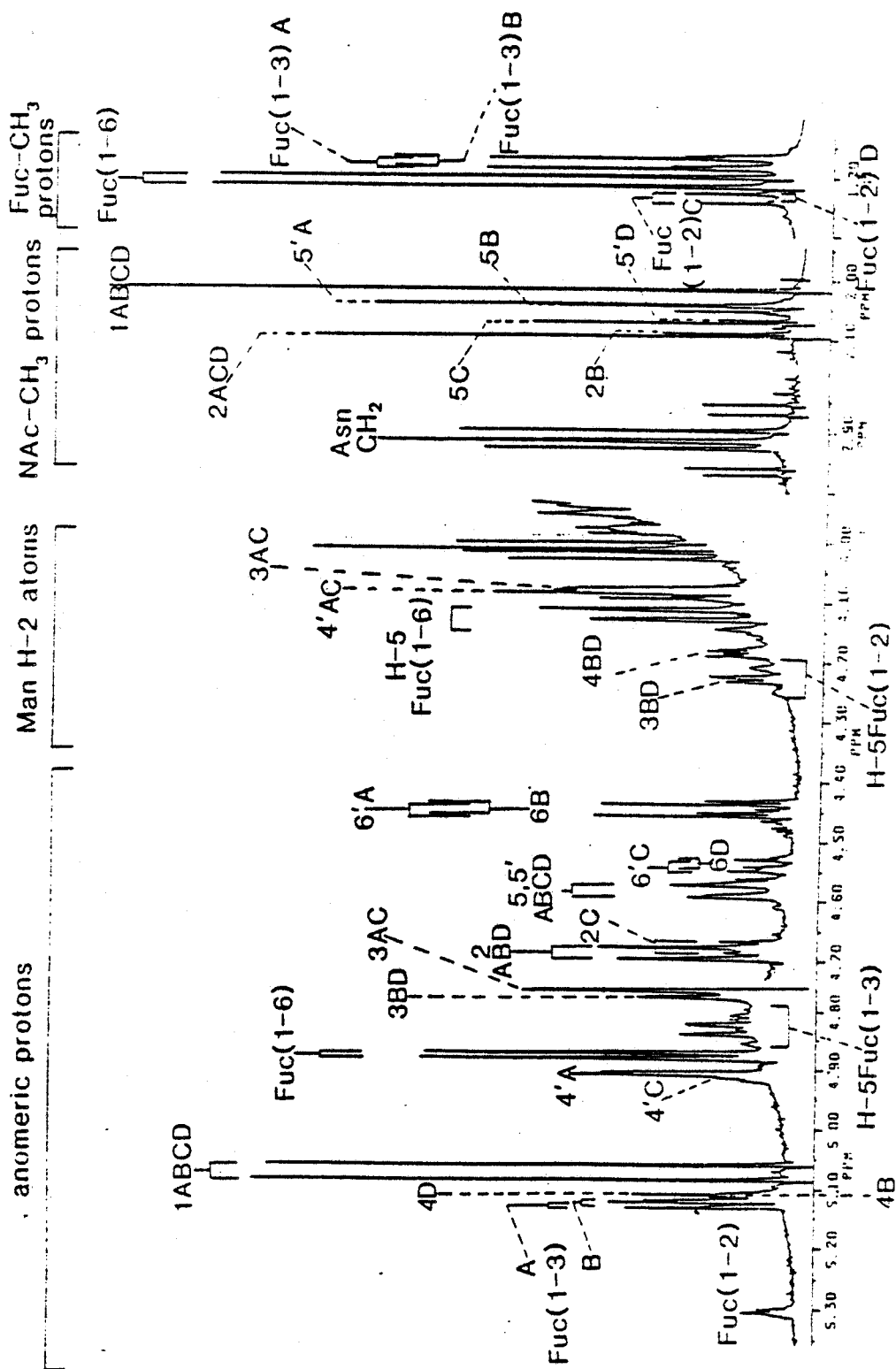
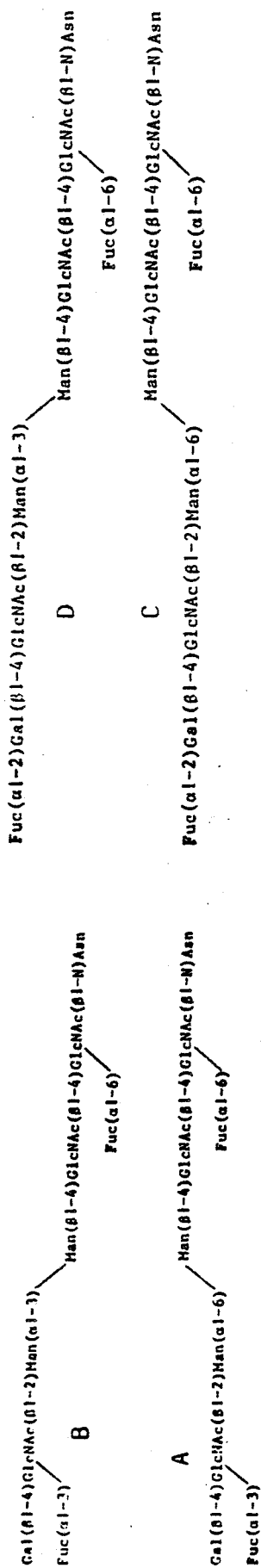
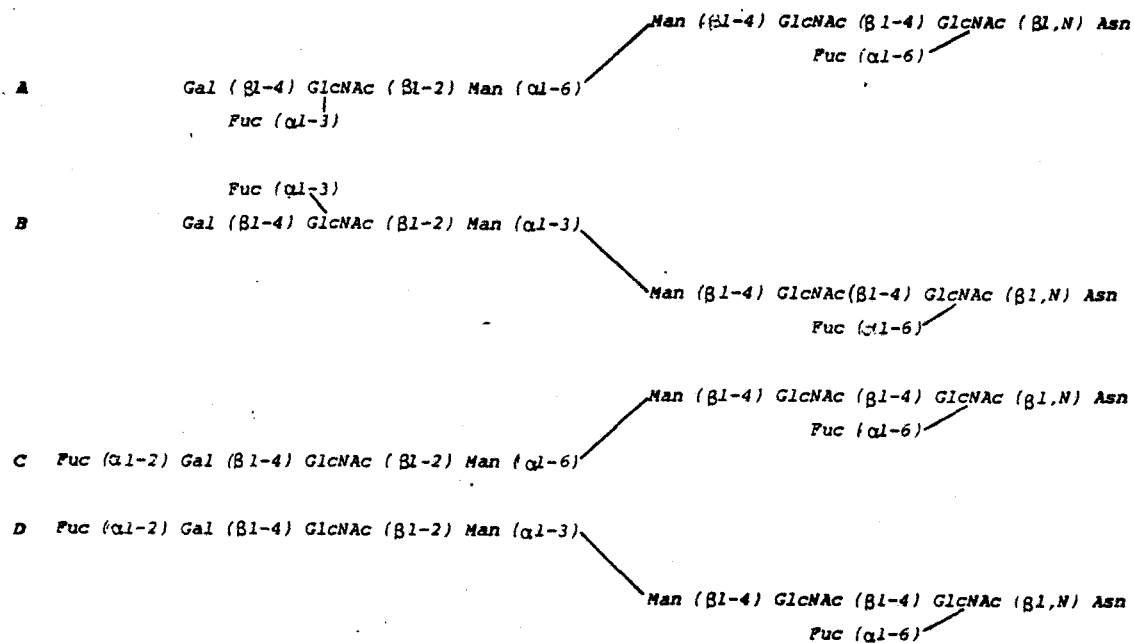


Fig. 44 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction XI



Nous retrouvons sur le spectre (Fig. 44, p. 100) ainsi que dans le Tableau IX, p. 107, les paramètres correspondants.

L'existence de la structure est attestée par le dédoublement des signaux du proton anomérique de *Fuc* ($\alpha 1-2$) ($\delta 5.307$ et $\delta 5.298$) et du méthyl de *Fuc* ($\alpha 1-2$) ($\delta 1.234$ et $\delta 1.232$).

Nous avons attribué les valeurs de H-1 de *Gal* et *GlcNAc* en nous basant sur le fait que les constituants A et C sont majeurs par rapport à B et D et que le proton anomérique de *Gal-6'* résonne toujours pour une valeur de champ plus faible que *Gal-6*. La comparaison de l'intensité des signaux propres à chacune des structures des fucosides de la fraction XI permet d'établir les rapports approximatifs de chacun des constituants : A : 60 % ; B : 25 % ; C : 12 % ; D : 3 %.

7. Fraction XII

La fraction XII constitue un épaulement du pic XI. Le spectre R.M.N. est très voisin du précédent (Fig. 45, p. 102) avec toutefois une différence qui porte sur l'intensité plus grande des signaux du proton anomérique de *Gal-6* ($\delta 4.440$) et du groupement acétamido de *GlcNAc-5* ($\delta 2.042$) et qui montre que le constituant XI B existe en proportion égale à celle de XI A. En revanche, le rapport des signaux observés à $\delta 4.686$ et $\delta 4.676$ (H-1 de *GlcNAc-2*) est demeuré inchangé, ce qui prouve que le doublet majeur à $\delta 4.686$ appartient aux structures A et B, tandis que le doublet à $\delta 4.676$ revient aux structures C et D. Cette précision permet de corriger les données précédemment publiées [VLIEGENTHART *et al.* (147)].

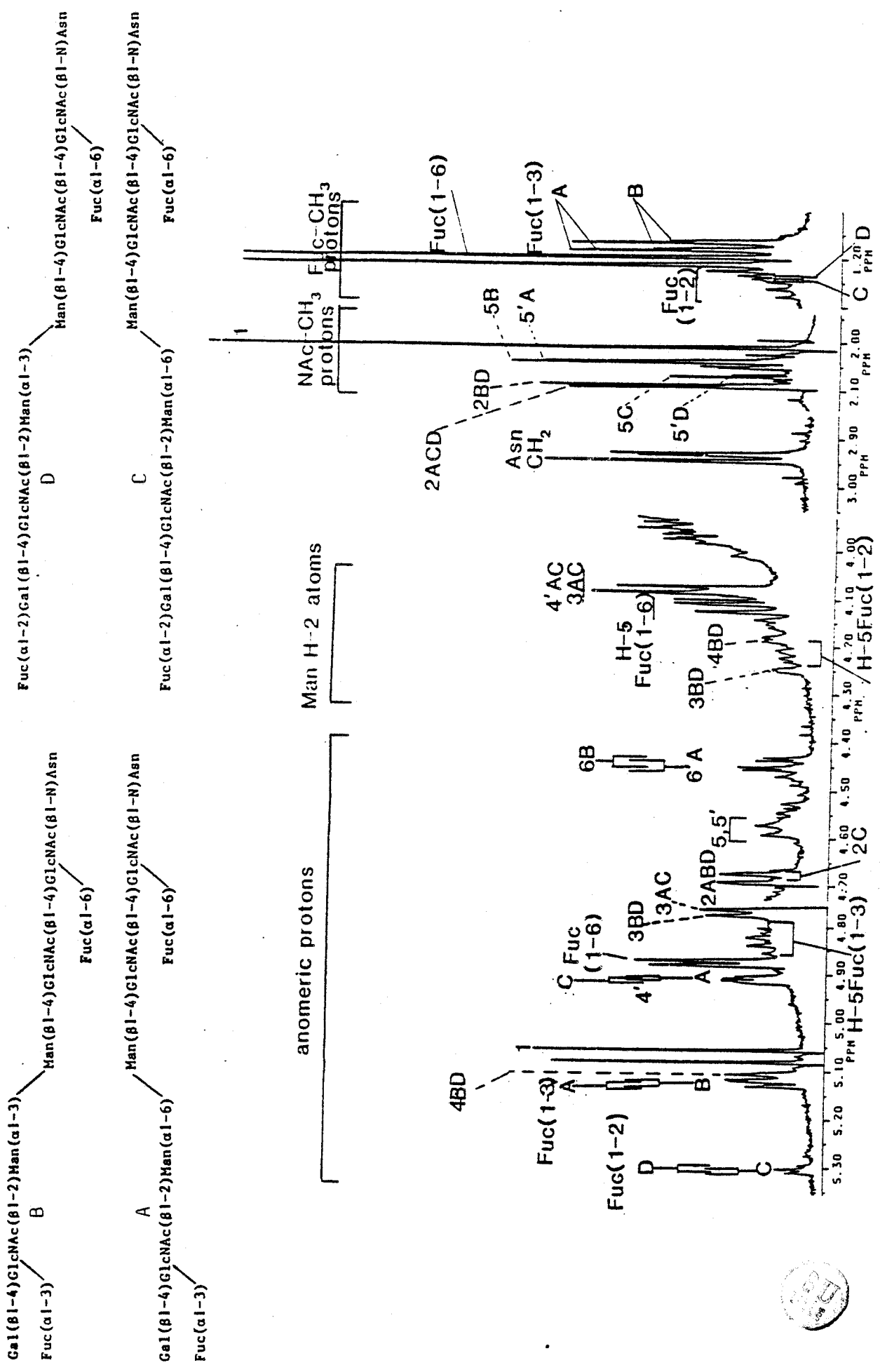


Fig. 45 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz de la fraction XII

8. Fractions XV et XVI

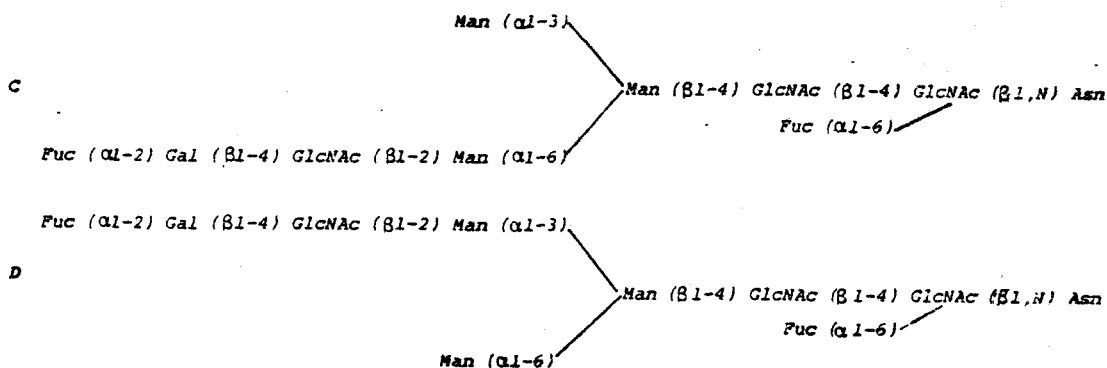
La séparation imparfaite des fucosides XV et XVI ne permet pas l'isolement de constituants purs. Les spectres de ces fractions présentent de ce fait de nombreuses analogies et, pour cette raison, seront analysés conjointement (Fig.46, p.104 et Fig. 47, p. 105)

Bien que de masse moléculaire légèrement supérieure à celle du fucoside XI, les fucosides XV et XVI fournissent un spectre semblable.

les liaisons du fucose en $\alpha 1-2$, $\alpha 1-3$ et $\alpha 1-6$ sont attestées par la présence de doublets à $\delta 1.220$, $\delta 1.238$, $\delta 1.173$, $\delta 1.176$ et $\delta 1.206$.

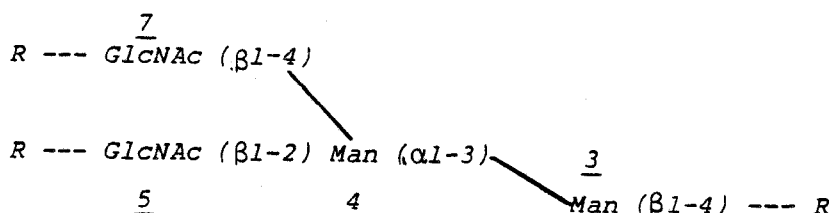
Le proton anomérique de Gal-6 ($\delta 4.441$) a une intensité supérieure à celle de Gal-6', tout comme celui de Man-4 par rapport à Man-4'.

En ce qui concerne le proton H-2 du Man-4, nous observons deux quadruplets, respectivement à $\delta 4.180$ (*Man substitué en C-2 par un résidu de N-acétylglucosamine*) et à $\delta 4.079$ (*Man non substitué*). A $\delta 4.092$, nous observons le signal du proton H-2 de Man-4' substitué par une N-acétylglucosamine. Sur la base de ces données, nous pouvons attribuer, aux fucosides des fractions XV et XVI, les structures majeures suivantes :



accompagnés des isomères possédant du fucose lié en ($\alpha 1-2$) sur le galactose.

Certains signaux demeurent difficiles à interpréter, tel le doublet à $\delta 4.207$, qui peut correspondre à H-2 de Man-3 engagé au sein d'une structure possédant la séquence :



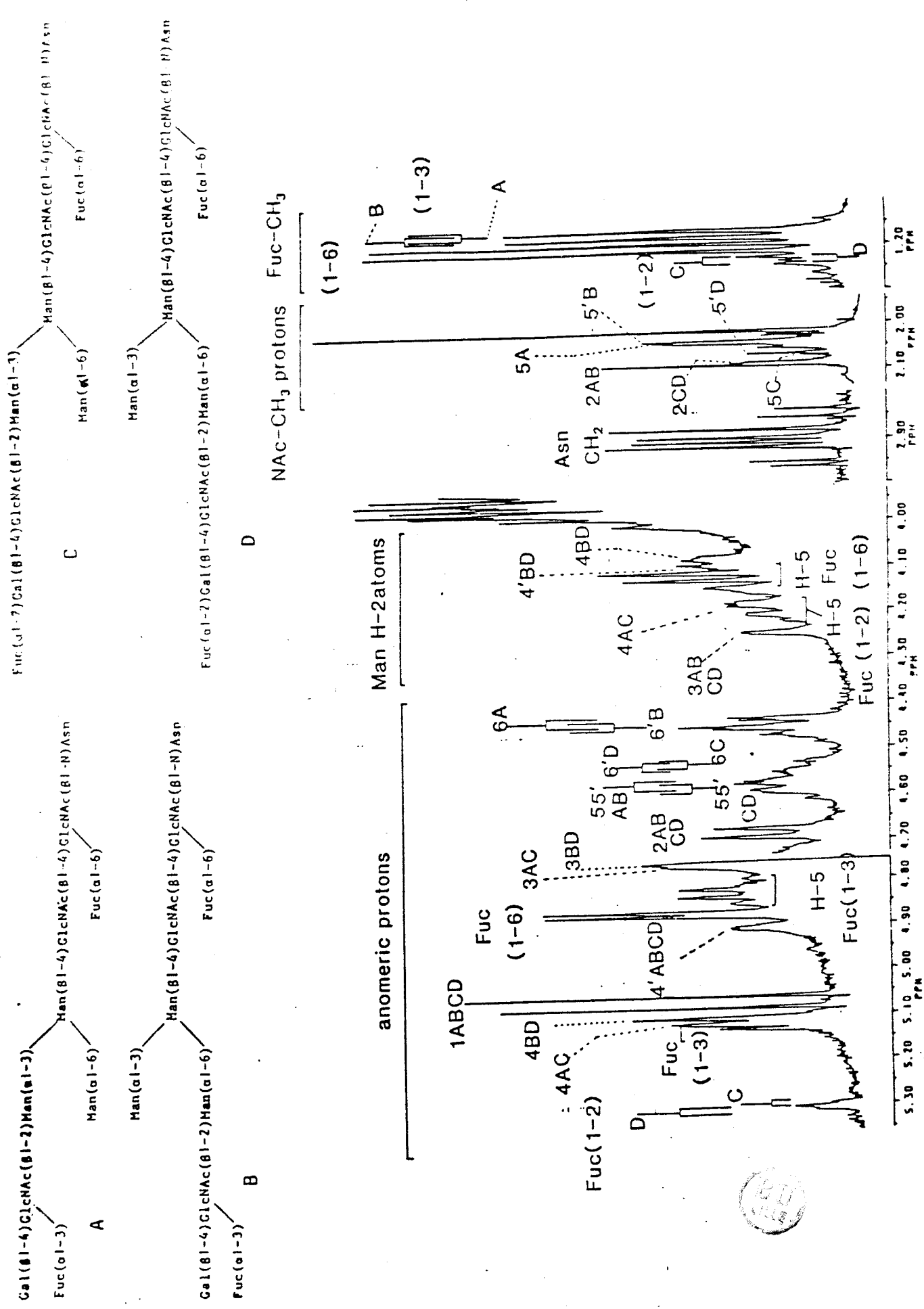


Fig. 46 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction XV

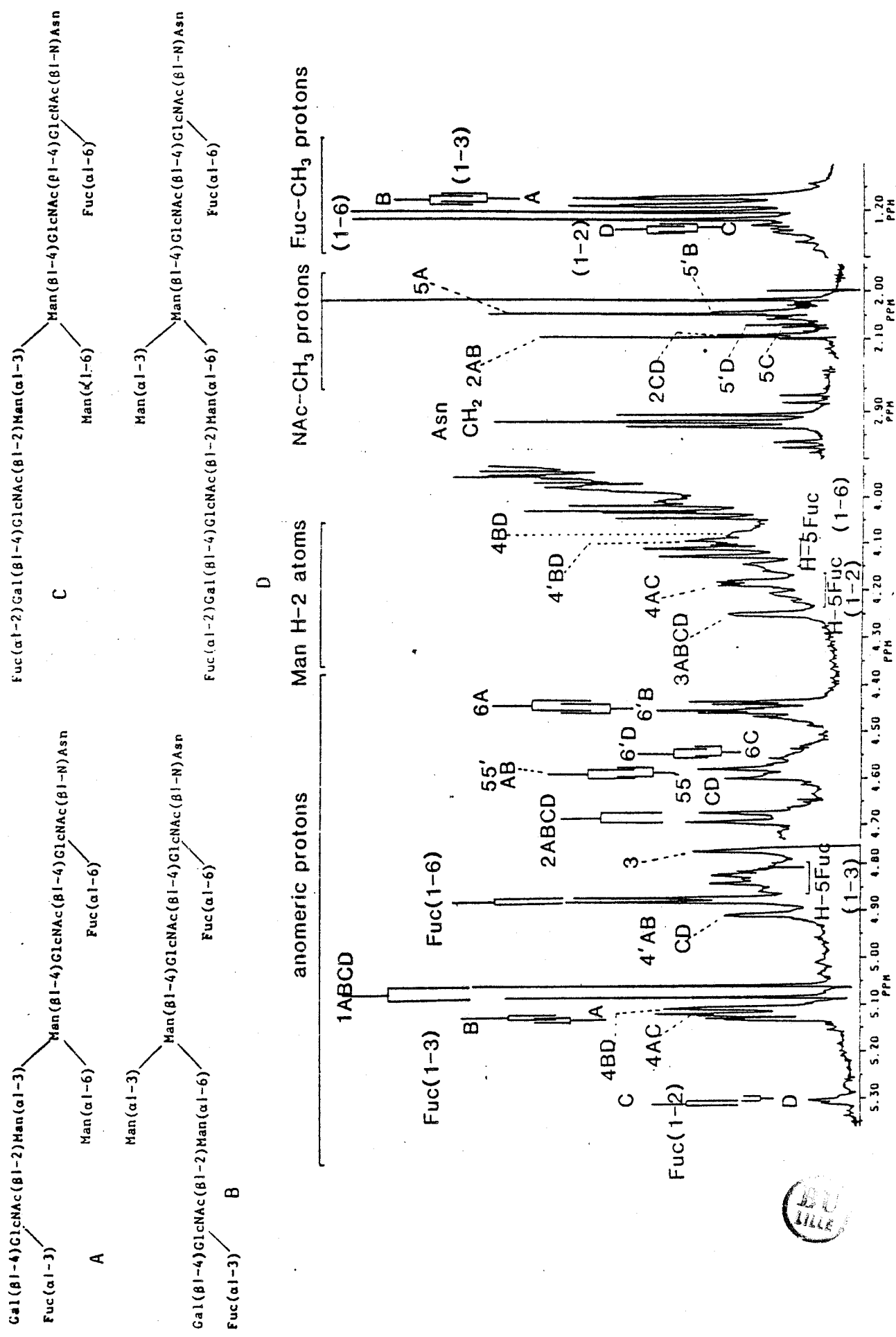


Fig. 47 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction XVI

H-1	5,095	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071	5,071
2	-	4,687	4,676	4,686	4,676	4,686	4,686	4,686	4,686	4,683	4,683	4,683
3	-	4,766	4,775	4,765	4,775	4,765	4,765	4,765	4,765	4,771	4,765	4,765
4	-	-	5,110	-	4,121	5,107	-	5,118	5,107	5,118	5,107	5,107
4'	-	4,913	-	4,917	-	4,582	4,905	4,909	4,909	4,909	4,909	4,909
5	-	-	4,577	-	4,585	4,582	4,582	5,587	5,587	5,581	5,581	5,581
5'	-	-	-	4,577	-	4,585	4,582	-	5,587	-	-	5,581
6	-	-	4,466	-	4,532	4,440	-	4,441	-	4,532	-	-
6'	-	-	-	4,470	-	4,540	4,446	-	4,447	-	-	4,541
a	-	4,531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuc(α1-2)	-	-	-	-	5,297	-	-	5,298	5,306	-	-	-
Fuc(α1-3)	-	-	-	-	-	5,125	5,123	-	-	5,125	-	5,124
Fuc(α1-6)	4,901	4,915	4,875	4,877	4,877	4,876	4,875	4,875	4,875	4,875	4,875	4,875
H-2	-	4,083	4,228	4,079	4,228	4,228	4,081	4,248	4,248	4,248	4,248	4,248
3	-	-	4,186	-	4,186	4,183	-	4,183	4,079	4,183	4,079	4,079
4	-	3,965	-	4	-	< 4	4,087	< 4	4,097	< 4	4,097	4,097
4'	-	-	-	-	4,227	-	-	4,227	4,227	-	-	-
H-5	-	-	-	-	4,227	-	-	4,227	4,227	-	-	-
Fuc(α1-3)	-	-	-	-	4,227	-	-	4,227	4,227	-	-	4,831
Fuc(α1-6)	4,117	4,118	4,123	4,123	4,123	4,121	4,121	4,120	4,120	4,120	4,120	4,120
CH ₃	-	-	-	-	1,228	-	-	1,228	1,234	-	1,234	-
Fuc(α1-6)	-	-	-	-	-	1,172	1,176	-	-	1,173	-	1,176
Fuc(α1-3)	1,214	1,212	1,207	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206
Fuc(α1-6)	-	2,014	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017	2,017
NAC	1	2,091	2,093	2,093	2,089	2,089	2,093	2,087	2,087	2,093	2,093	2,093
2	-	2,050	-	-	2,079	2,043	-	2,071	-	2,043	-	-
5	-	-	-	-	-	-	2,040	-	-	-	-	-
5'	-	-	2,046	2,072	-	-	-	-	2,066	-	-	2,039

Tableau IX : Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glyco-asparagines II à XVI



En ce qui concerne le signal H-2 de *GlcNAc*, deux doublets sont présents à $\delta 4.686$ et $\delta 4.676$ dans le rapport 10:8. Cependant, l'examen du spectre XII dans lequel prédominent les structures *Gal* ($\beta 1-4$) [*Fuc* ($\alpha 1-3$)] *GlcNAc* ($\beta 1-2$) *Man* ($\alpha 1-6$) *Man* ($\beta 1-4$) *GlcNAc* ($\beta 1-4$) [*Fuc* ($\alpha 1-6$)] *GlcNAc* ($\beta 1,N$) *Asn* et *Gal* ($\beta 1-4$) [*Fuc* ($\alpha 1-3$)] *GlcNAc* ($\beta 1-2$) *Man* ($\alpha 1-3$) *Man* ($\beta 1-4$) *GlcNAc* ($\beta 1-4$) [*Fuc* ($\alpha 1-6$)] *GlcNAc* ($\beta 1,N$) *Asn*, le doublet à $\delta 4.686$ représente 80% du signal ce qui permet d'attribuer à H-1 de *GlcNAc-2*, du constituant mineur de la structure identique à VIII-C, la valeur $\delta 4.676$.

Le rapport 10:8 observé à propos du signal H-1 de *GlcNAc-2* dans le spectre VIII conduit à attribuer les valeurs de $\delta 4.686$ et $\delta 4.676$ à H-1 de *GlcNAc-2* des structures A et B, respectivement.

Le glissement chimique de H-1 de *GlcNAc-2* de la structure possédant un résidu de fucose lié en ($\alpha 1-2$) sur *Gal-6* peut être défini par comparaison des spectres XI et XII. En effet, cette structure existe en plus forte proportion dans la fraction XI et il en résulte une intensification du doublet à $\delta 4.686$.

En ce qui concerne le signal du méthyl du groupement acétamido du spectre VIII, nous pouvons aisément attribuer aux structures VIIIA et VIIIB, la valeur $\delta 2.093$ et, à la structure VIIIC, la valeur $\delta 2.089$ puisque VIIIA et VIIIB représentent ensemble plus de 75% du mélange. Contrairement au signal H-1 de ces mêmes composés, la position de l'antenne ne joue ici aucun rôle.

En revanche, pour les constituants XI, XIIA et XIIB, qui possèdent un résidu de fucose lié en ($\alpha 1-3$) sur *GlcNAc-5* ou *5'*, le glissement chimique du méthyl du groupement acétamido de *GlcNAc-2* est en fonction du type de liaison ($\alpha 1-3$) ou ($\alpha 1-6$) du mannose. En effet, une étude antérieure [VLIEGENTHART (147)] dans laquelle un tel glyco-asparagine renfermait essentiellement du fucose ($\alpha 1-3$) sur le résidu *GlcNAc-5'* possédant un signal intense à $\delta 2.093$.

Dans la fraction XI et XII, les rapports *Fuc* ($\alpha 1-3$) *GlcNAc-5'* / *Fuc* ($\alpha 1-3$) *GlcNAc-5* sont respectivement 6:2 et 4:2 et il en résulte une nette augmentation du signal à $\delta 2.089$ dans le cas de l'enrichissement de la liaison *Fuc* ($\alpha 1-3$) *GlcNAc-5*.

Nous avons précédemment attribué à $\delta 2.089$ le glissement chimique de CH_3 de l'acétamido de *GlcNAc-2* du glyco-asparagine terminé par la séquence *Fuc* ($\alpha 1-2$) *Gal* ($\beta 1-4$) *GlcNAc*-, seul le glissement chimique du méthyl de l'acétamido de *GlcNAc-2* du glyco-asparagine possédant la séquence *Fuc* ($\alpha 1-2$) *Gal* ($\beta 1-4$) *GlcNAc* n'a pu ici être établi précisément mais une étude antérieure [VLIEGENTHART (147)] a permis de lui attribuer la valeur $\delta 2.089$. Dans le cas de structures où s'ajoute soit le mannose-4, soit le mannose-4' en position terminale non réductrice (XV et XVI), le signal de H-1 de *GlcNAc-2* possède un glissement chimique toujours égal à $\delta 4.683$.



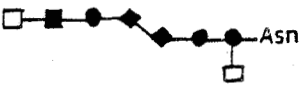



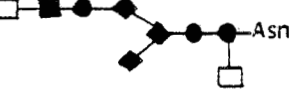


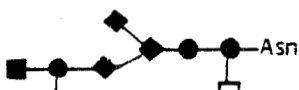
	H-1	Méthyl de l'acétamido
	4,686	2,093
	4,676	2,093
	4,686	2,089
	4,676	2,089
	4,686	2,089
	4,686	2,093
	4,683	2,087
	4,683	2,087
	4,683	2,093
	4,683	2,093



Tableau X. :

Glissements chimiques du proton anomérique et méthyl de l'acétamido de GlcNAc-2

En revanche, le dédoublement du signal du méthyl du groupement acétamido de *GlcNAc-2* demeure observé mais les deux glyco-asparagines possédant un résidu de fucose lié en ($\alpha 1-3$) fournissent une valeur δ du CH_3 de l'acétamido de *GlcNAc* identique à $\delta 2.093$.

Compte tenu du faible taux de fucose lié en ($\alpha 1-2$) de ces constituants et de l'intensité néanmoins relativement élevée du signal à $\delta 2.089$, il semble probable que cette valeur corresponde à la fois aux résidus 5 et 5' des glyco-asparagines renfermant une telle liaison du fucose.

Les valeurs de ces différents paramètres sont rassemblés dans le Tableau X, p. 109.

B. ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (G.C./M.S.) DES FRACTIONS GP 6 A GP 9, GP 11 ET GP 13

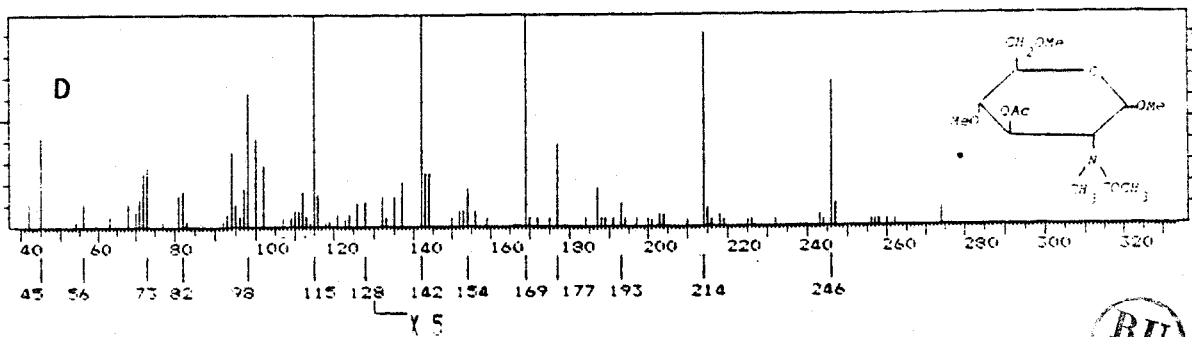
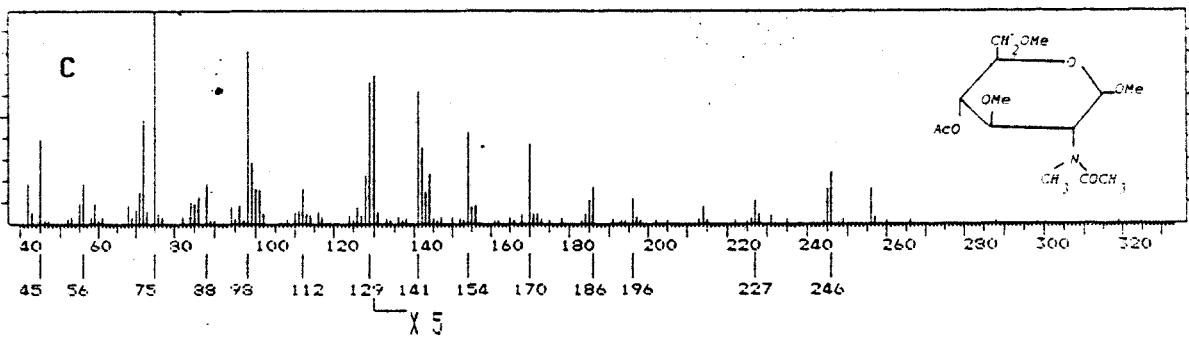
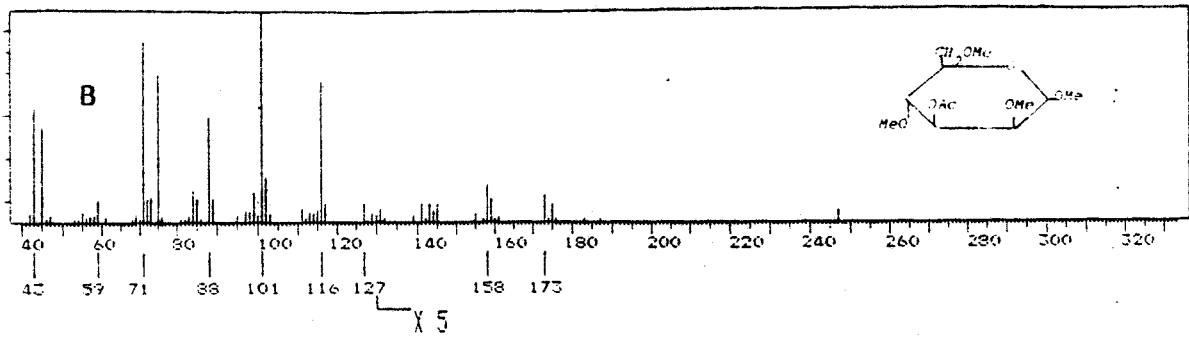
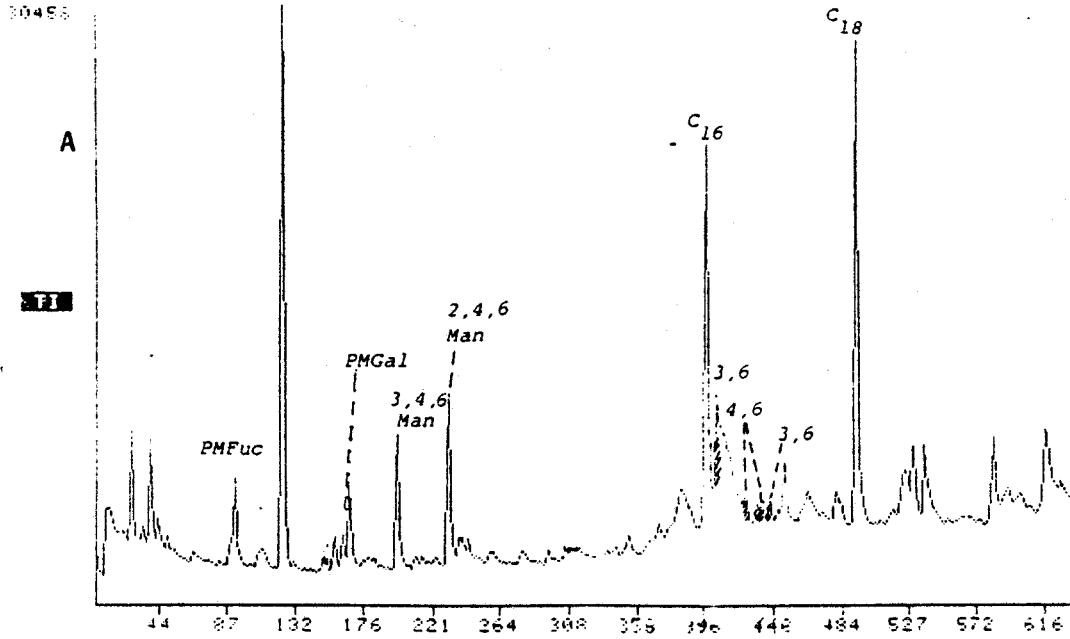
Les fractions VI, VII, VIII et IX ont été rassemblées et chromatographiées par C.L.H.P. de phase inverse. Le profil chromatographique est donné à la Fig. 35, p. 86.

Nous observons plusieurs pics mais seuls les pics notés GP 6, GP 7, GP 8, GP 9, GP 11 et GP 13 ont été perméthylés, méthanolysés, peracétylés et analysés par spectrométrie de masse.

1. Le GP 6

La méthylation du GP 6 (Fig. 48, p. 111) fournit du 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose, du 3,4,6-tri-O-méthyl-mannose, du 2,4,6 tri-O-méthyl-mannose et un mélange équi-moléculaire de 3,6 et 4,6-di-O-méthyl-N-acétylglucosamine. La 3-mono-méthyl-N-acétylglucosamine dérivant de la séquence $\text{GlcNAc} (\beta 1-4) [\text{Fuc} (\alpha 1-6)] \text{GlcNAc} (\beta 1, N) \text{Asn}$ est systématiquement absente des diagrammes d'analyse en phase gazeuse par suite de l'absence de coupure de la liaison $\text{GlcNAc} (\beta 1, N) \text{Asn}$ par le méthanol-chlorhydrique. La présence de cette séquence a toutefois été vérifiée par analyse en R.M.N.- ^1H à 400 MHz. Une liaison $\text{Man}(\beta 1-3) \text{GlcNAc}$ étant fort improbable dans l'état de nos connaissances sur la structure des glycanes, il paraît plus judicieux de proposer la séquence $\text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNAc}$ pour expliquer l'origine de la 4,6 di-O-méthyl-N-acétylglucosamine. La structure de GP 6 est donc celle reprise à la p. 112.

NAME: 6% fuc
 RISC

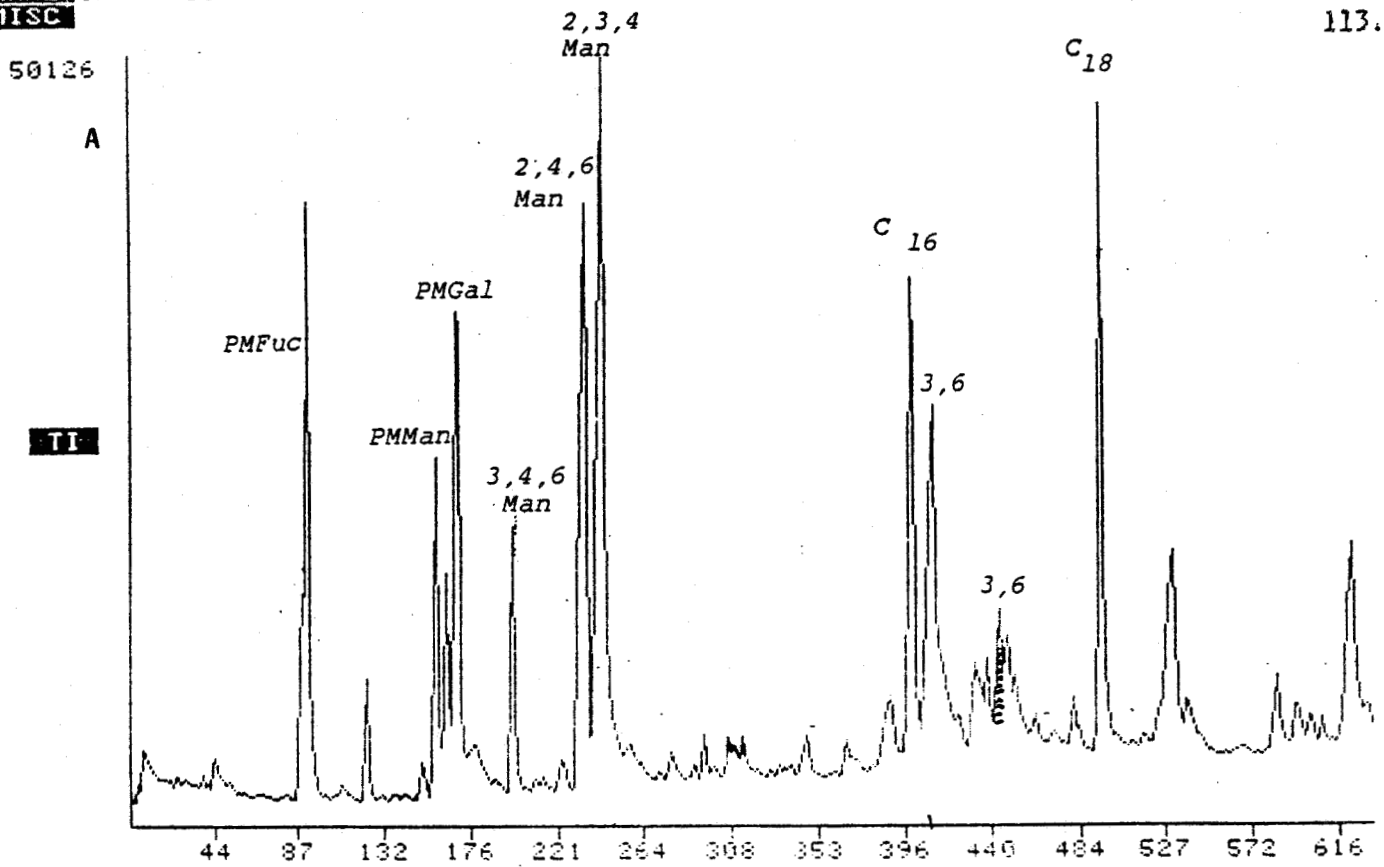


BU
LILLE

Fig. 48 :

Spectres de masse des éthers méthyliques obtenus après méthanolyse de GP 6

- A. Spectre total
 B. 3-mono-acétyl-2,4,6-tri-O-méthylmannose
 C. 4-mono-acétyl-1,3,6-tri-O-méthylglucosamine
 D. 3-mono-acétyl-1,4,6-tri-O-méthylglucosamine



SIDAR FUC GP 8 IOUL SILSCB 30M 110/240/5 04-11-86

FICHER: AH1 .DA TABLE D'ACQUISITION: DEFACQ .AT
100% = 591683 X 100

DATE: 11/4/1978

TOTAL

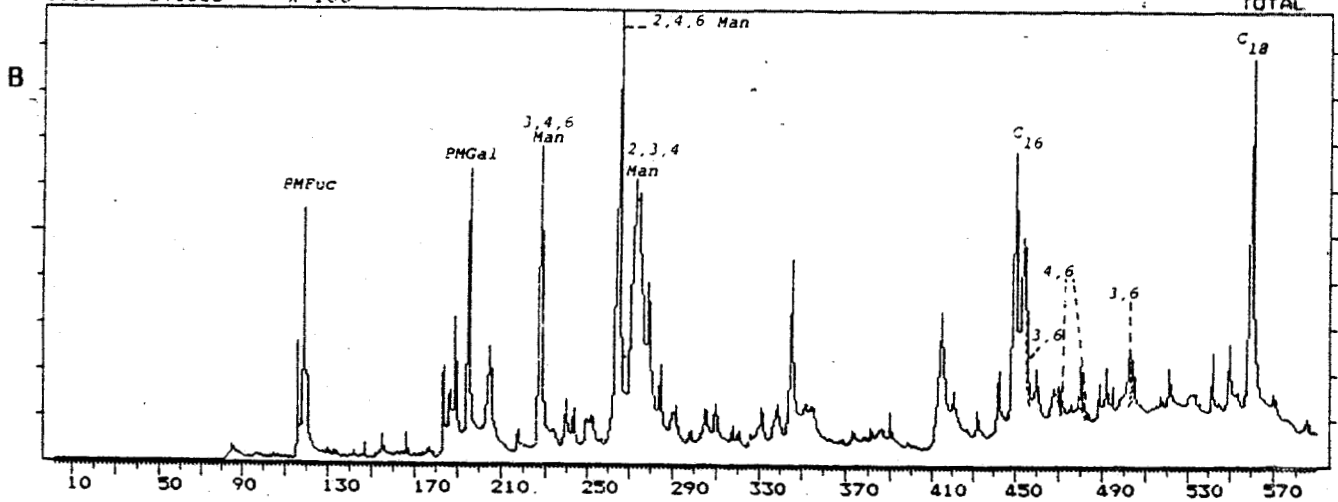


Fig. 49 :

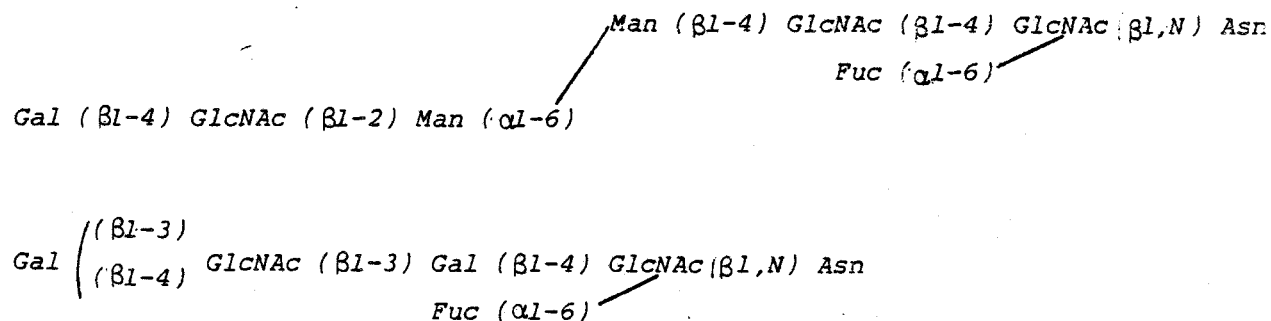
Spectres de masse des éthers méthyliques obtenus après méthanolyse de GP 7 (A) et de GP 8 (B)

Dans le cas de GP 8 A, nous excluons ici la séquence *Gal* (β 1-3) *GlcNAc* déjà rencontrée dans l'étude de GP 6. L'analyse R.M.N.- 1 H devrait aisément confirmer ces structures.

4. Le GP 9

L'analyse des éthers méthyliques obtenus après méthylation de GP 9 (Fig. 50, p.115) ne permet pas de proposer de structures pour les glyco-asparagines de cette fraction. En effet, la présence simultanée de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose et de 2,3,4-tri-O-méthyl-mannose, liée à la faible intensité du pic de 3,4,6-tri-O-méthyl-mannose, rend improbable la présence de ces trois résidus de sucres dans la même molécule. Il faudrait d'ailleurs alors supposer l'existence d'une séquence *Fuc* (α 1-3) *Gal* pour expliquer la présence de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose et, en conséquence, expliquer ainsi le nouveau type de liaison de fucose détecté par R.M.N.

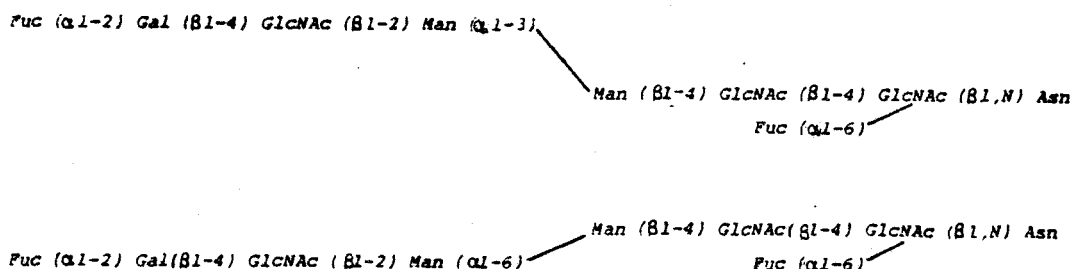
Une autre hypothèse consiste à considérer la fraction GP 9 comme étant constituée du mélange suivant :

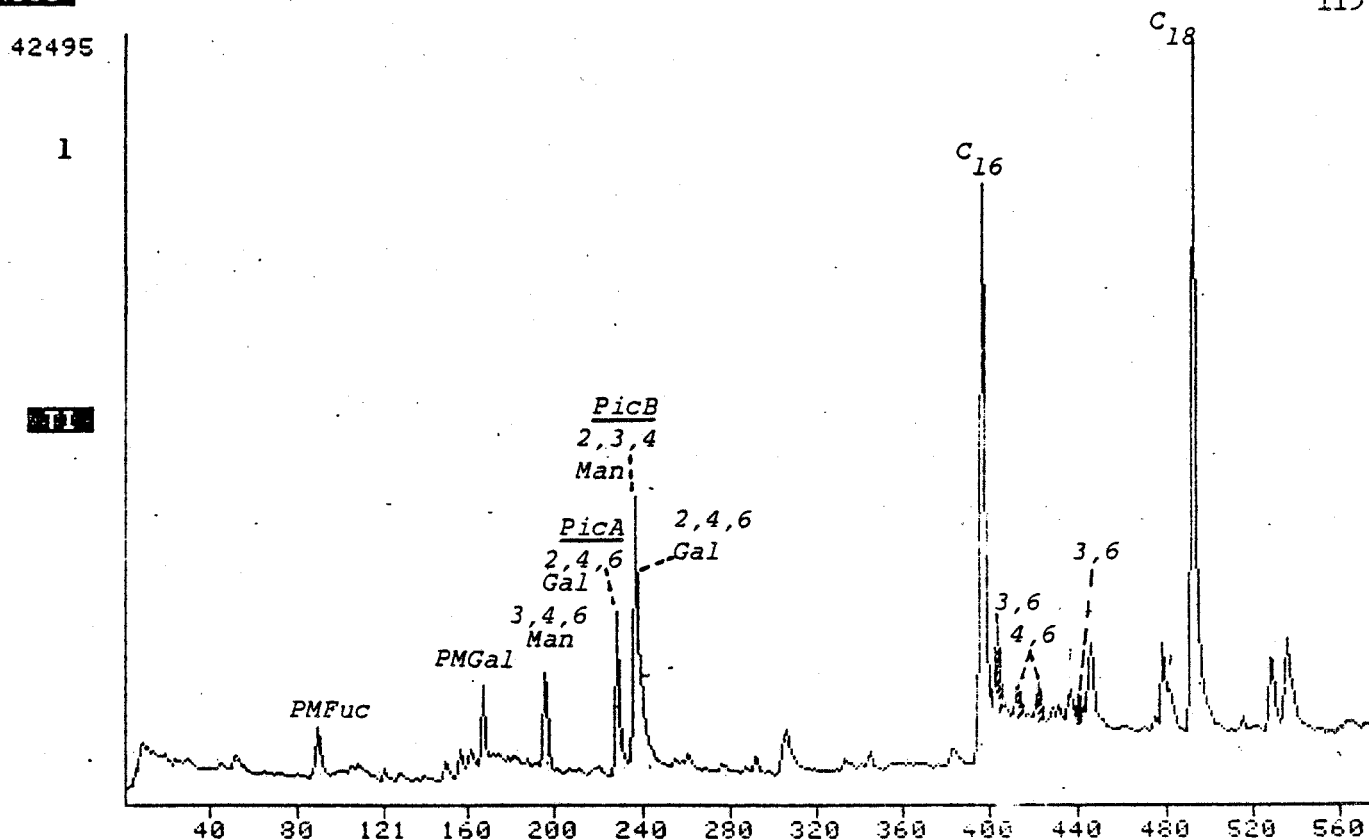


Des études ultérieures permettront de préciser ces structures.

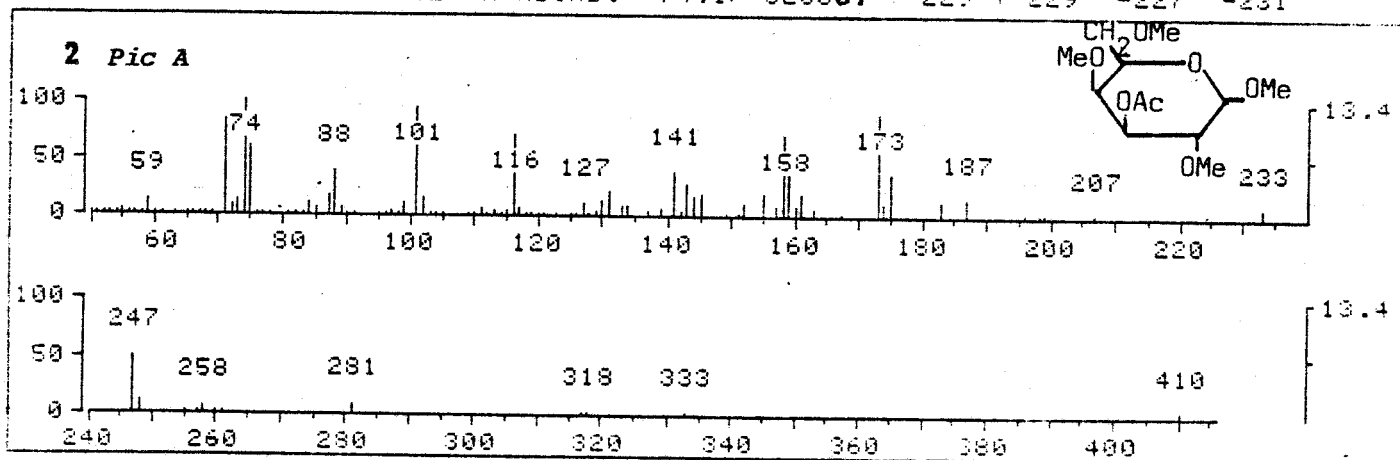
5. Le GP 11

L'analyse des éthers méthyliques issus de GP 11 (Fig.51, p. 116) fournit essentiellement du 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose, du 3,4,6 ; 2,4,6 et 2,3,4-tri-O-méthyl-mannose et du 3,4,6-tri-O-méthyl-galactose accompagné de 3,6-di-O-méthyl-N-acétylglucosamine (*dérivé majeur*) et de 4,6-di-O-méthyl-N-acétylglucosamine (*traces*). La fraction GP 11 est donc constituée des deux constituants majeurs suivants :





AVERAGED SPECTRUM * BASE PK/ABUND: 74.1/ 32000. + 229 + 229 -227 -231



AVERAGED SPECTRUM * BASE PK/ABUND: 88.1/ 32000. + 237 + 237 -235 -240

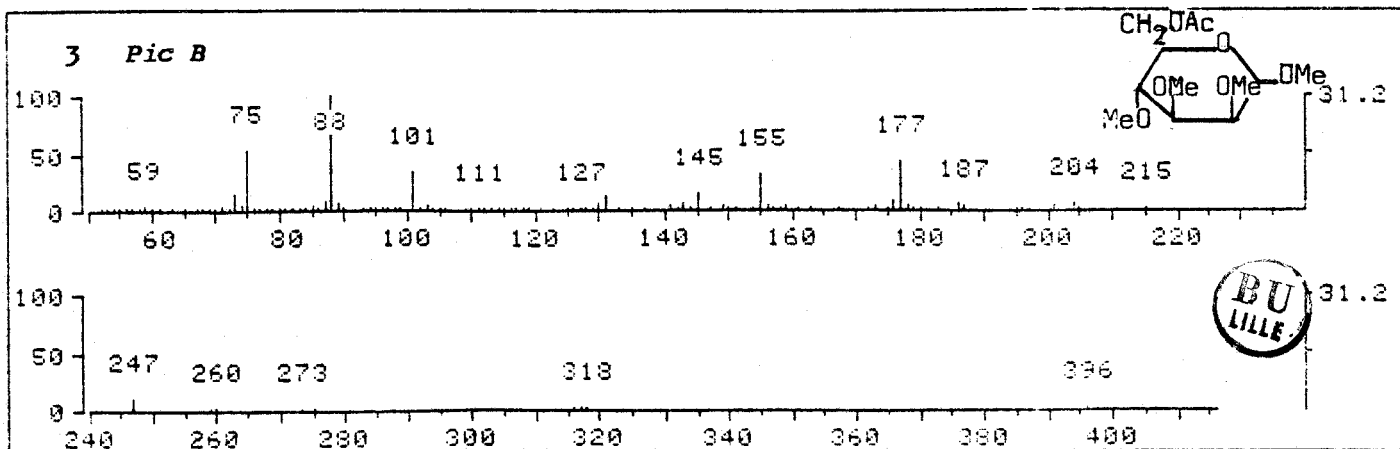


Fig. 50 :

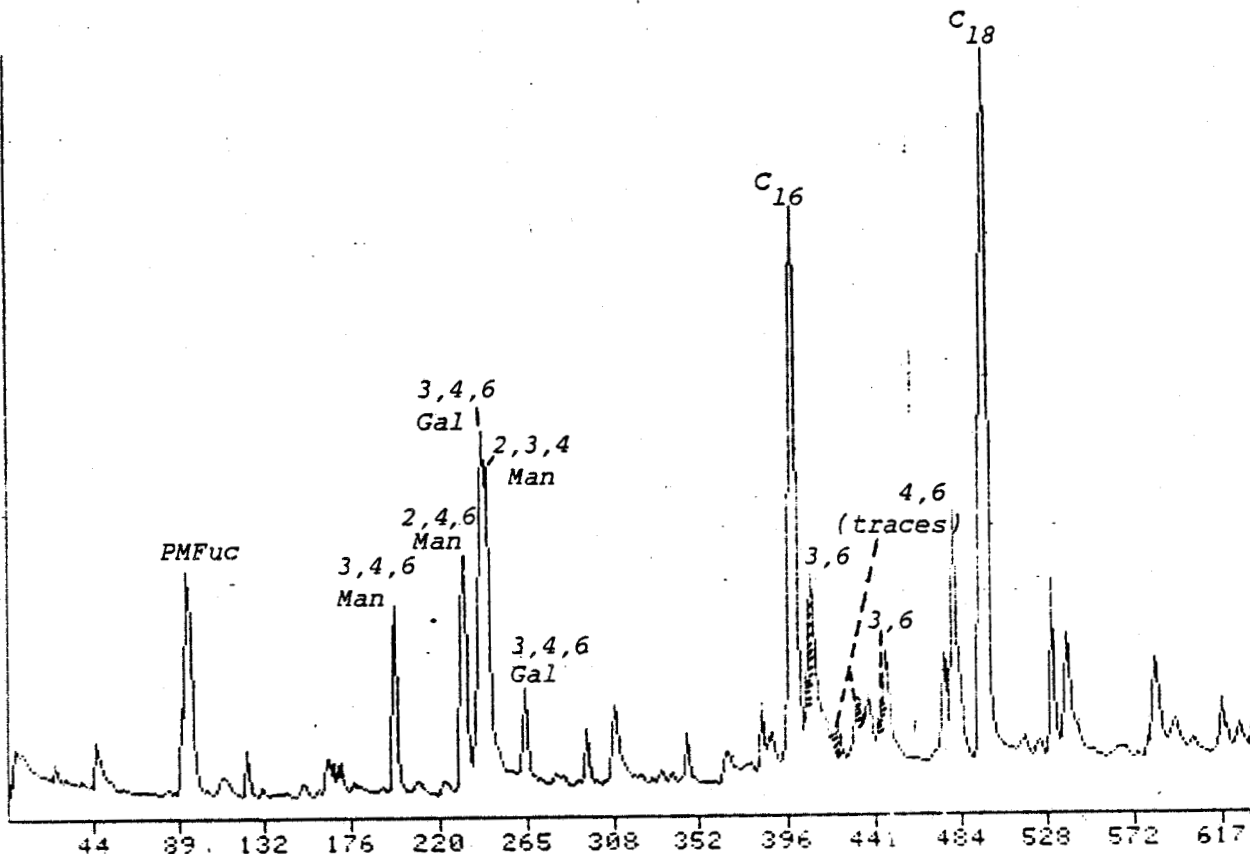
Spectres de masse des éthers méthyliques obtenus après méthanolyse de GP 9

1. Spectre total
2. Pic A : 3-mono-acétyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactose
3. Pic B : 6-mono-acétyl-2,3,4-tri-O-méthylmannose

80292

A

TI



60751

B

TI

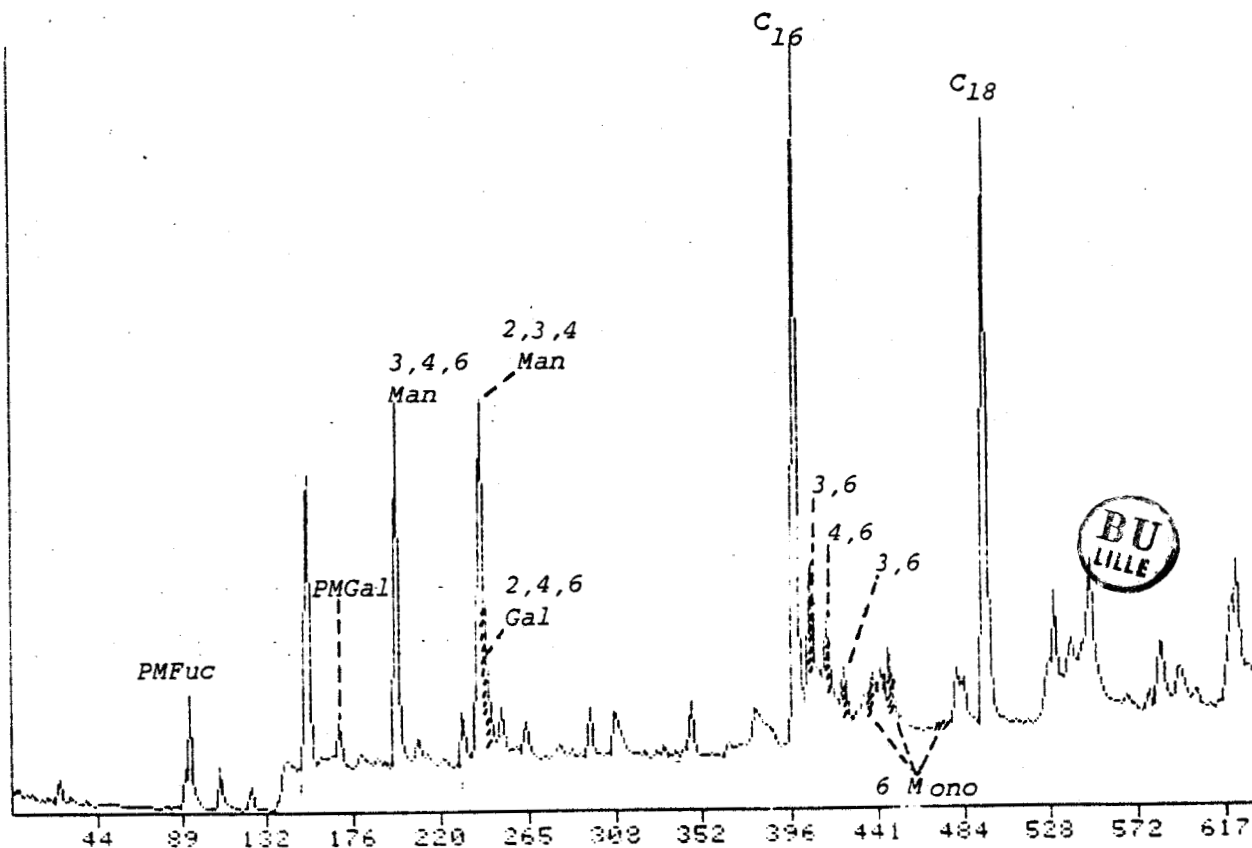
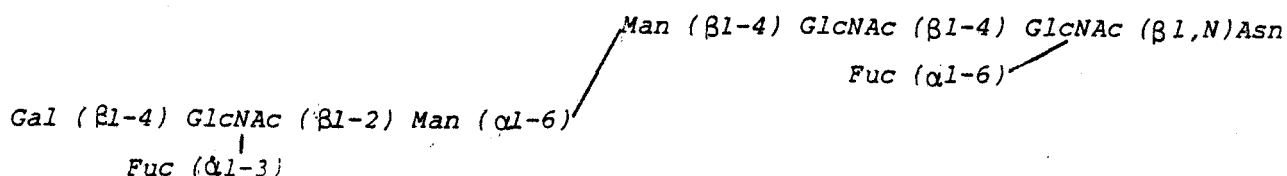


Fig. 51 :

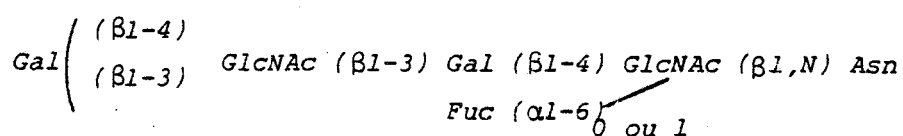
Spectres de masse des éthers méthyliques obtenus après méthanolyse de GP 11 (A) et de GP 13 (B)

6. Le GP 13

L'analyse des éthers méthyliques obtenus après méthylation de la fraction GP 13 est présentée dans la Fig.51, p.112. Les dérivés majeurs (3,4,6 et 2,3,4-tri-O-méthyl-mannose) et la présence de 6-mono-O-méthyl-N-acétylglucosamine permettent d'établir la structure du glyco-asparagine suivant :



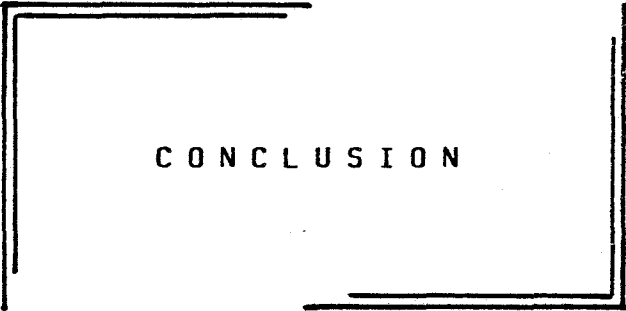
La présence de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose et de 4,6-di-O-méthyl-N-acétylglucosamine peut en revanche être due à l'existence de structures du type :



III. CONCLUSION

L'analyse par C.L.H.P. sur colonne AX-10 ne nous a pas permis d'obtenir des entités pures. Néanmoins, les mélanges étant généralement dans le rapport 4:1 pour les produits A et B dans un pic donné et dans un rapport 1:4 pour les produits B et C dans le pic suivant, il nous a donc été possible de déterminer la structure primaire des fucosides par comparaison de l'intensité de chaque signal, d'un spectre à l'autre.

Toutefois, chacune des fractions sera recyclée par C.L.H.P. de phase inverse puis analysée à nouveau par R.M.N.-¹H. Ainsi, la nouvelle liaison du fucose dénommée ($\alpha 1-x$) sera déterminée et correspondra peut-être à la structure pressentie $\text{Fuc } (\alpha 1-3) \text{ GlcNAc}$ en position terminale non réductrice.



CONCLUSION

Les recherches, que nous avons effectuées sur la structure des chaînes glycaniques du méconium de nouveau-né et de l'urine de malades atteints de fucosidose, s'inscrivent dans la thématique du Laboratoire de Chimie Biologique (*Laboratoire national et unité associée au C.N.R.S. n° 217*) sur la structure et le métabolisme des glycoprotéines. Le travail effectué est d'ordre méthodologique et consiste en la description de nouvelles structures fucoglyco-asparagiques.

Les conclusions générales que nous pouvons tirer sur l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

1. les travaux effectués sur le méconium démontrent de nouveau la grande hétérogénéité des structures glycaniques déjà constatée au Laboratoire et confirmée par les travaux du groupe de FEIZI. Cette hétérogénéité, dans le cas des N-glycopeptides, est étendue à la partie peptidique, ce qui rend le sous-fractionnement par les méthodes chromatographiques conventionnelles plus difficile.
 - a. l'utilisation de la seule R.M.N.- ^1H à 400 MHz (*technologie moderne d'investigation des structures*) a permis de déterminer la structure de treize fucoglyco-asparagines dérivant probablement du catabolisme des N-glycoprotéines foetales.
 - b. L'étude par R.M.N.- ^1H a permis de signaler :
 - la présence d'une dualité de structures glyco-asparagiques avec ou sans N-acétylglucosamine intercalaire
 - un trait commun aux glyco-asparagines du méconium qui consiste en la présence d'un résidu de fucose substituant en ($\alpha 1-6$) le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache
 - la caractéristique fonctionnelle peu répandue à savoir la présence de composés possédant à la fois une N-acétylglucosamine intercalaire et un résidu de fucose lié en ($\alpha 1-6$) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache.

- c. les structures ainsi décrites représentent des marqueurs de différentes étapes du catabolisme foetal. Ce phénomène est ordonné dans ce sens que la dégradation enzymatique est une dégradation récurrente "branche après branche"
- d. Le méconium renferme plusieurs centaines de glycopeptides et oligosaccharides en mélange. Ce milieu biologique, facile à obtenir, constitue donc un matériel de choix pour l'obtention de glyco-asparagines de référence destinés à des études d'ordre biologique, chimique ou physique.
2. La détermination de la structure de glyco-asparagines excrétés dans l'urine de malades atteints de fucosidose a été réalisée uniquement par Résonance Magnétique Nucléaire du proton à 400 MHz. Cette étude a permis :
- a. de démontrer la présence d'une nouvelle liaison du fucose, liaison que nous avons dénommée ($\alpha 1-x$) au cours de notre étude. Cette liaison ($\alpha 1-x$) pourrait être attribuée à une N-acétylglucosamine terminale non réductrice substituée en ($\alpha 1-3$) par un résidu de fucose (fractions VI et VII). Les structures isolées de l'urine dérivent du catabolisme des N-glycoprotéines. Ainsi, la présence d'une telle structure pourrait être imputée à l'action d'une β -galactosidase. Toutefois, ceci reste une hypothèse puisque GATHMAN et AMINOFF (158) ont démontré que la β -galactosidase ne peut agir lorsque la N-acétylglucosamine de la liaison Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc- est substituée. En effet, le résidu substituant cette N-acétylglucosamine provoque un encombrement stérique. De plus, les composés possédant cette liaison ($\alpha 1-x$) sont mineurs.
- b. d'établir, par analyse R.M.N.- ^1H et par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, que certaines fractions contenaient la structure Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc ($\beta 1-3$) Gal ($\beta 1-4$) [Fuc($\alpha 1-6$)] GlcNAc ($\beta 1,N$) Asn.
- La séquence Gal ($\beta 1-3$) GlcNAc- n'a été jusqu'à présent mise en évidence que dans peu de glycanes liés N-glycosidiquement à l'aglycone [BERNARD *et al.* (159)].

3. Les différentes fractions obtenues d'urine de patients atteints de fucosidose vont être recyclées et repurifiées par chromatographie liquide haute pression puis analysées à nouveau par R.M.N.-¹H et par étude en "fast atom bombardment-mass spectrometry" qui donnera des fragments caractéristiques du glycanne, notamment pour les séquences dans lesquelles est impliqué un résidu de fucose.

Notre travail sur l'urine de patients atteints de fucosidose ayant conduit à la description de structures glycaniques, les structures proposées ainsi que l'argumentation relative à la liaison *Fuc* ($\alpha 1-x$) restent hypothétiques.



A D D E N D U M

Au moment où nous imprimons ce mémoire, de nouveaux résultats nous parviennent. Ils concernent l'étude par R.M.N.- ^1H à 400 MHz des fractions GP 6, GP 8, GP 10, GP 11 et GP 13 qui, jusqu'à présent, n'avaient été étudiées que par méthylation et analysées en spectrométrie de masse.

Le Tableau X p.122 donne les nouvelles valeurs des glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glyco-asparagines.

I. LES GP 6 ET GP 10

La Fig. 52 p.123 nous donne les spectres R.M.N.- ^1H à 400 MHz de ces deux fractions.

Dans les spectres, nous observons la présence d'un seul type de liaison fucosyl qui correspond à du fucose lié en ($\alpha 1-6$) [$\delta \text{CH}_3 = 1,206 \text{ ppm}$; $\delta \text{H-5} = 4,120 \text{ ppm}$ et $\delta \text{H-1} = 4,885 \text{ ppm}$].

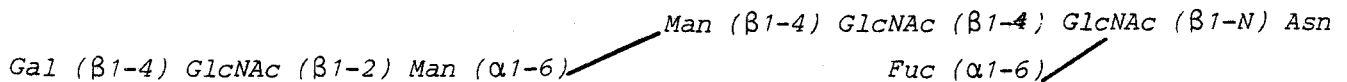
La fraction GP 6 renferme les signaux relatifs à H-1 de Man-3, 4, GlcNAc-5 et Gal-6. La structure de GP 6 correspond à un glycanne ne possédant que la branche supérieure.

La fraction GP 10 présente les déplacements chimiques caractéristiques de Man-3, 4' ; GlcNAc-5' et Gal-6' et correspond quant à elle à une structure possédant la branche inférieure.

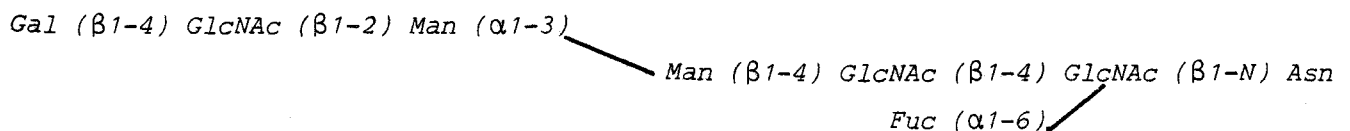
Les paramètres ont les valeurs classiques d'une liaison Gal ($\beta 1,4$) GlcNAc. Par méthylation, nous n'avons obtenu que de la 3,6 di-O-méthyl-N-acétylglucosamine. Dans les deux cas, le résidu de galactose est donc lié en ($\beta 1-4$) sur la N-acétylglucosamine.

Les structures proposées pour GP 10 et GP 6 sont les suivantes :

GP 10



GP 6



Groupes représentatifs		Résidus	GP-1	GP-2	GP-3	GP-4	GP-5	GP-6	GP-7	GP-8	GP-9	GP-10	GP-11	GP-12		
H-1	de	GlcNAc-1	5.074	5.076	5.076	5.076	5.073	5.075	5.071	5.072	5.071	5.071	5.072	5.072	5.072	
		GlcNAc-2	4.677	4.686	4.676	4.686	4.676	4.687	4.676	4.685	4.676	4.686	4.677	4.683	4.683	
		Man-3	4.677	4.758	4.765	4.759	4.677	4.764	4.775	4.757	4.775	4.763	4.765	4.777	4.777	
		Man-4	5.122	-	5.109	-	5.112	-	-	5.106	-	5.110	-	5.109	-	
		Man-4'	-	4.917	-	4.917	-	4.906	-	4.907	-	4.905	-	4.915	-	
		GlcNAc-5	4.573	-	4.560	-	4.561	-	4.533	-	4.580	-	-	-	-	
		GlcNAc-5'	-	4.577	-	4.577	-	4.566	-	4.551	-	4.582	-	-	-	
		Gal ₄ -6	4.466	-	-	-	-	-	-	4.454	-	4.441	-	-	-	-
		Gal ₃ -6'	-	4.472	-	-	-	-	-	-	4.538	-	4.446	-	-	-
		Gal ₃ -6	-	-	4.471	-	4.466	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Gal ₄ -6'	-	-	-	4.540	-	4.539	-	-	-	-	-	-	-	-
		GlcNAc-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.578	-
		Gal ₄ -8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.440	-
		GlcNAc-7'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.598
		Gal ₂ -8'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.465
		Fuc ₃	-	-	5.308	5.308	-	-	-	5.299	5.302	-	-	-	-	-
		Fuc ₄	-	-	-	-	-	-	5.003	5.008	-	5.123	5.125	5.111	5.111	5.111
Fuc ₆	4.877	4.877	4.877	4.877	4.877	4.877	4.877	4.875	4.874	4.877	4.875	4.877	4.877	4.877		
H-2	de	Man-3	4.228	4.079	4.186	4.078	4.228	4.075	4.18 ^B	4.078	4.227	4.080	4.251	4.079	4.079	
		Man-4	4.188	-	4.110	-	4.187	-	4.13 ^B	-	4.183	-	4.186	-	-	
		Man-4'	-	4.098	-	4.098	-	4.089	-	4.08	-	4.085	-	4.112	-	
H-5	de	Fuc ₃ ²	-	-	4.206	4.206	-	-	4.20 ^B	4.216	-	-	-	-	-	
		Fuc ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	4.822	4.829	4.830	4.830	4.830	
		Fuc ₆	4.121	4.121	4.121	4.121	4.121	4.121	4.120	4.125	4.121	4.120	4.121	4.121	4.121	
CH ₃	de	Fuc ₃ ²	-	-	1.229	1.229	-	-	1.216	1.234	-	-	-	-	-	
		Fuc ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	1.172	1.176	1.176	1.176	1.176	
		Fuc ₆	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	
NAc	de	GlcNAc-1	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	2.016	
		GlcNAc-2	2.072	2.095	2.072	2.095	2.072	2.095	2.072	2.095	2.072	2.095	2.072	2.091	2.091	
		GlcNAc-5	2.050	-	2.079	-	2.037	-	2.065	-	2.043	-	-	-	-	
		GlcNAc-5'	-	2.046	-	2.047	-	2.035	-	2.052	-	2.040	-	-	-	
		GlcNAc-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.066	-	
GlcNAc-7'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.050			



Tableau X :

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glyco-asparagines GP 1 à GP 12

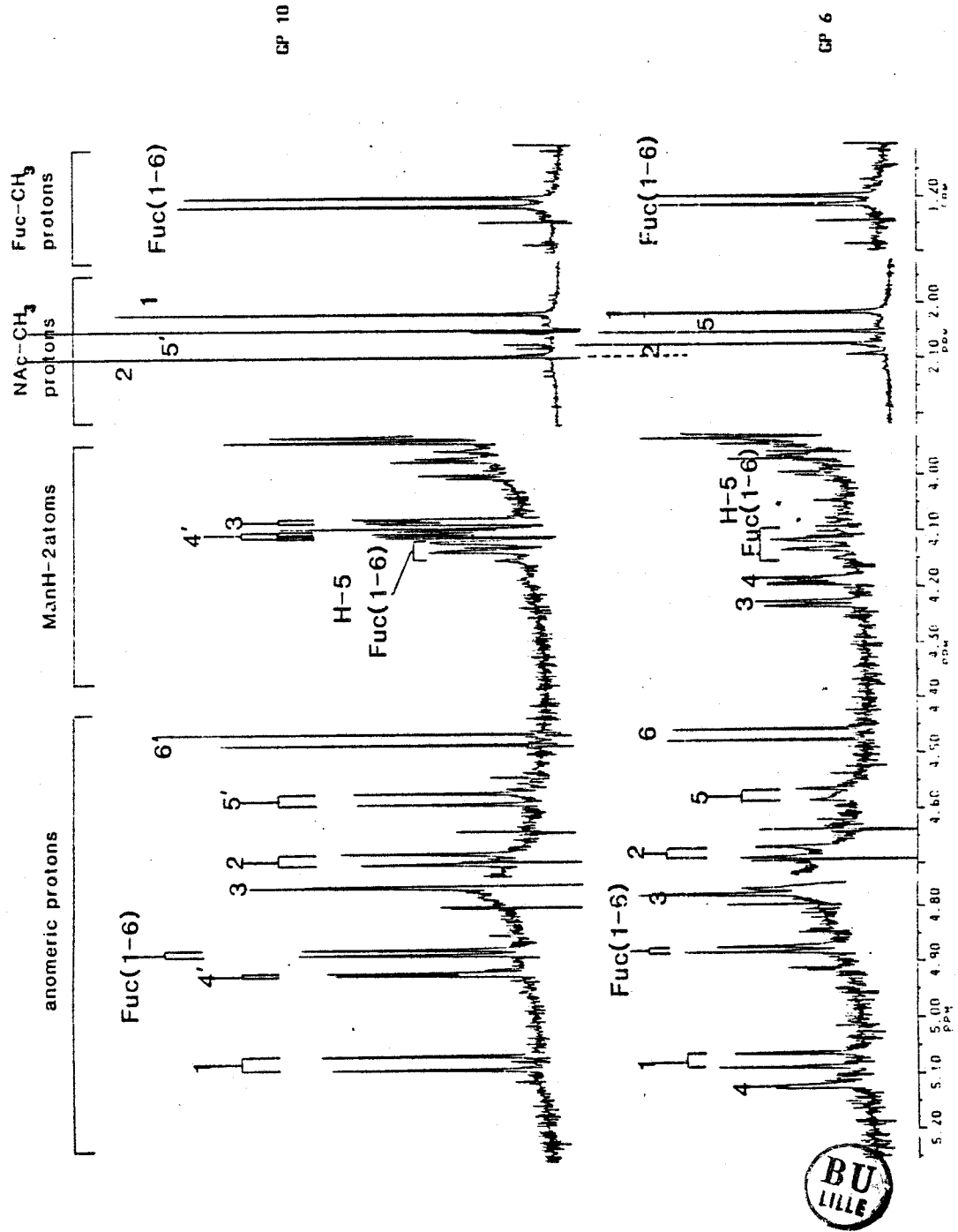


Fig. 52 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz des fractions GP 6 et GP 10

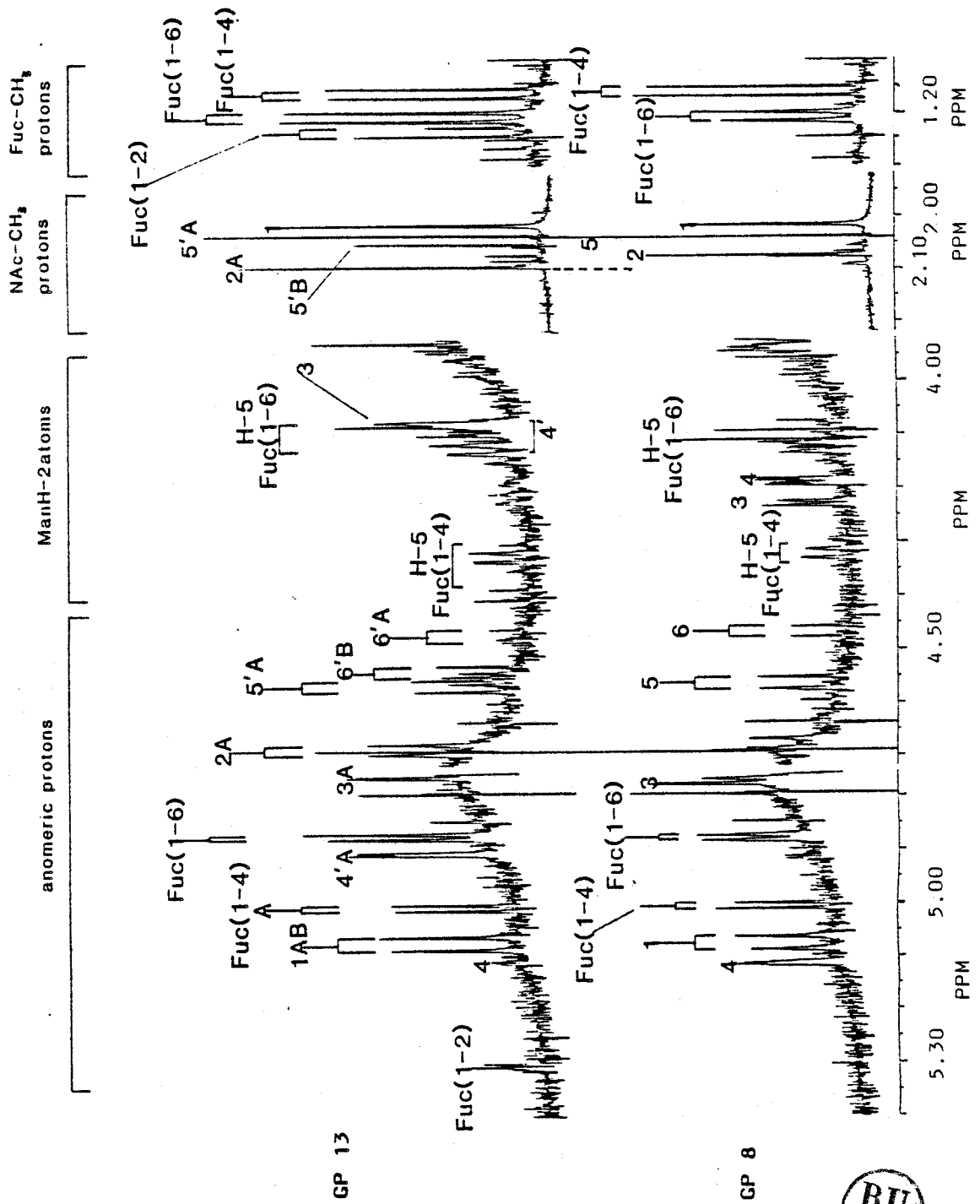


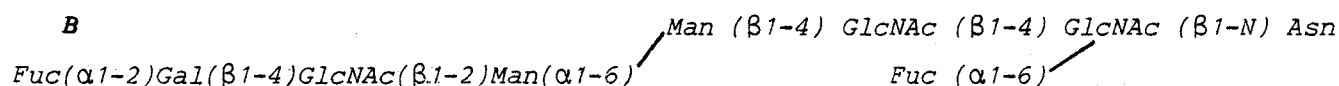
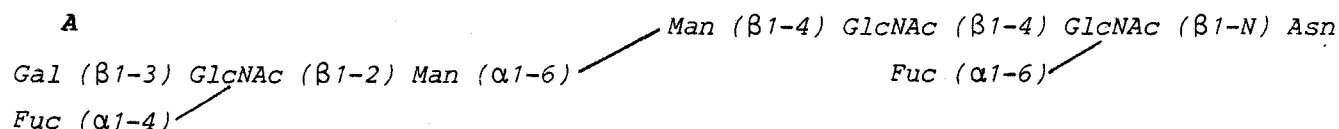
Fig. 53 : Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 MHz des fractions GP 8 et GP 13

Fig. 53 :

Les valeurs des glissements chimiques des protons anomériques de *GlcNAc-5'* et *Gal-6'* sont également différentes des données de la littérature. Par méthylation et analyse en spectrométrie de masse, nous obtenons dans un rapport équimoléculaire de la 3,6 di-O-méthylsamine et de la 4,6 di-O-méthylsamine.

La fraction GP 13 est donc le mélange des deux structures suivantes :

GP 13



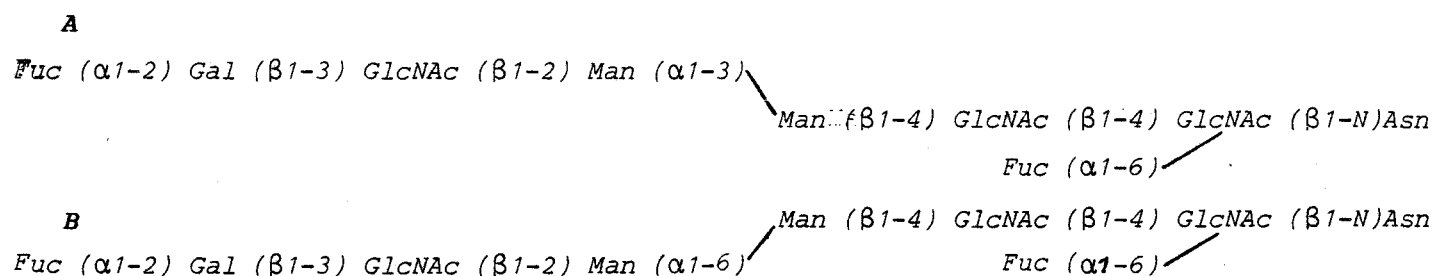
La structure A représente le constituant majeur. Depuis, nous avons réussi à séparer ces deux composés par C.L.H.P. de phase inverse sur colonne O.D.S. C_{18} .

III. LE GP 11

Sur le spectre (Fig. 54, p.127), nous observons, dans la zone des groupements méthyl du fucose, deux doublets correspondant respectivement au fucose du point d'attache lié en ($\alpha 1-6$) sur l'osamine 1 et a un fucose lié en ($\alpha 1-2$). Le rapport des intensités relatives de H-1 de Man-4 et H-1 de Man-4' est de 2:1.

Les glissements chimiques des protons anomériques de *GlcNAc-5*, *5'* et *Gal-6*, *6'* sont inconnus dans la littérature. Par spectrométrie de masse, nous avons obtenu dans un rapport équimoléculaire de la 3,6 di-O-méthylsamine et de la 4,6 di-O-méthylsamine. La somme de ces deux résultats permet de proposer pour GP 11 le mélange des deux structures.

GP 11



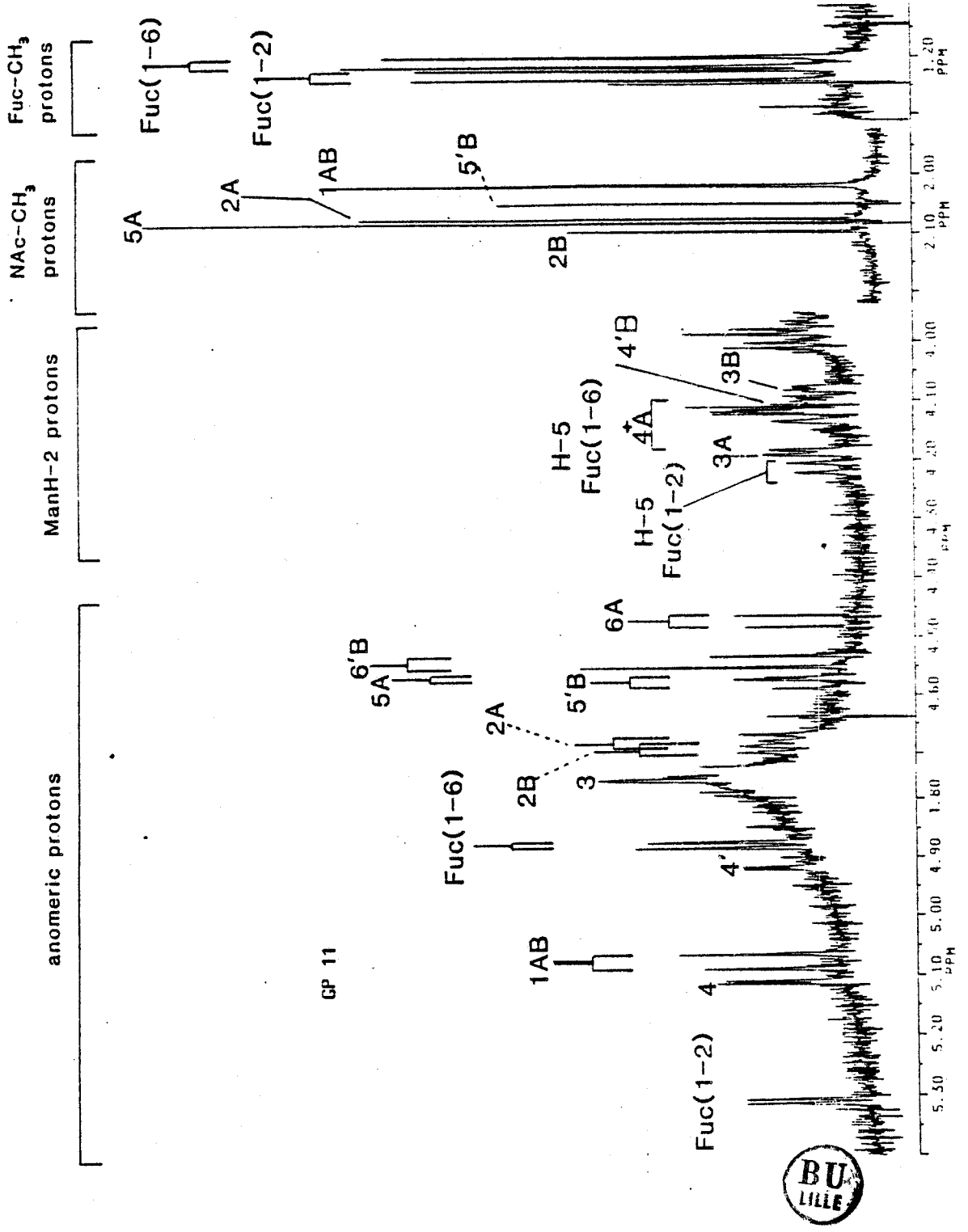


Fig. 54 :

Spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) du proton à 400 Mhz de la fraction GP 11

IV. CONCLUSION GENERALE

Grâce aux derniers résultats obtenus, nous avons isolé et caractérisé 33 fucoglyco-asparagines dont nous avons précisé les paramètres principaux de R.M.N.-¹H à 400 MHz. Neuf de ces structures n'avaient jamais été décrites jusqu'à présent.

Parmi ces structures nouvelles figurent, en particulier, des glycanes qui renferment la séquence *Gal* (β 1-3) *GlcNAc*.

La séquence *Gal* (β 1-3) *GlcNAc* a été, pour la première fois, caractérisée en 1979 par KOBATA dans la prothrombine bovine. Depuis, cette séquence a été souvent décrite dans les glycoprotéines du sérum de boeuf. Elle a été également caractérisée par BERNARD *et al.* (159) dans l'hémopexine de rat.

Nous la décrivons ici pour la première fois chez l'homme. En outre, nous montrons que cette séquence *Gal* (β 1-3) *GlcNAc*, qui est de type I, porte les déterminants de groupe sanguin H. Rappelons que les seules structures de groupe sanguin associées à des N-glycanes étaient jusqu'à ce jour liées à une chaîne de type II, c'est-à-dire *Gal* (β 1-4) *GlcNAc*.

La deuxième observation porte sur l'absence, dans notre liste, de structures glycaniques apparemment caractéristiques du tissu foetal. Le seul fait à retenir est la grande richesse du méconium en structures qui possèdent une osamine intercalaire. En effet, ce type de structure, qui plus est fucosylé en α 1-6, est peu répandu dans l'organisme humain. Il a été caractérisé dans les IgA du lait par PIERCE-CRETEL *et al.* (150).

Un troisième point concerne le catabolisme des glycoconjugués. En effet, HERLANT-PEERS *et al.* (34) ont isolé du méconium une douzaine d'oligosaccharides neutres ou sialylés ne possédant à leur extrémité réductrice terminale qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine. L'activité d'endo-N-acétylglucosaminidase capable d'agir sur des substrats sialylés avait donc de ce fait été envisagée.

En revanche, au cours de notre étude sur les fucosides, nous n'avons rencontré que des glyco-asparagines. BAUSSANT (151) a montré que le catabolisme des N-glycanes commence par l'action d'une aspartamidase active seulement sur des glycanes dépourvus de fucose au point d'attache.

Il a été, en outre, montré que le glycanne majeur accumulé dans l'urine de fucosidose était le glycoasparagine limite suivant :

Man (α 1-6) *Man* (β 1-4) *GlcNAc* (β 1-4) *GlcNAc* (β 1-N) *Asn*

Fuc (α 1-6)

Ce glycoasparagine suggère ainsi que le fucose inhibe également l'action de l'omannosidase. Les études structurales que nous avons réalisées vont toutes dans le sens du schéma de catabolisme séquentiel des N-glycannes, récemment décrit au Laboratoire, qui fait intervenir successivement la fucosidase, l'aspartylglucosaminidase et une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase active seulement sur des oligosaccharides terminés par du chitobiose.

Un quatrième et dernier point nous permet d'apporter quelques éléments nouveaux sur la conformation des glycannes et le rôle du fucose lié au point d'attache.

En effet, si nous consultons le Tableau XI p.130, où ne figurent que 2 paramètres R.M.N., nous observons les faits suivants :

- le proton anomérique de *GlcNAc-2* et le méthyl du groupement acétamido résonnent respectivement à δ :4,632 et à δ :2,070 lorsque le fucose est absent.

L'addition de fucose au point d'attache n'altère en rien les valeurs du glissement chimique relatif à *GlcNAc-1* mais provoque une nette modification des glissements chimiques relatifs à *GlcNAc-2* qui passent respectivement à δ :4,686 et δ :2,095.

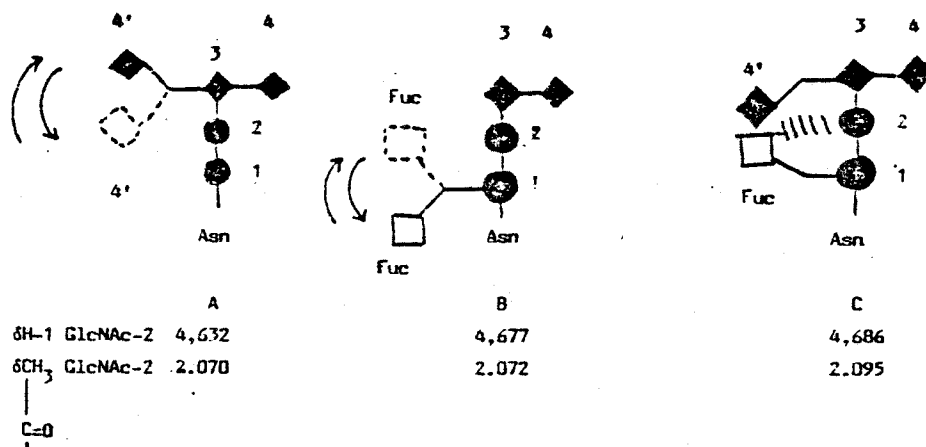
Ceci avait été expliqué par une interaction du fucose avec ce résidu de glucosamine n°2.




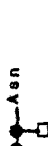





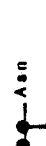


La modification de ces paramètres avait d'ailleurs toujours été à la base de l'identification du fucose lié au point d'attache et ceci s'est révélé toujours exact, qu'il s'agisse de structures di-antennées neutres ou sialylées, où même dans le cas de structures partiellement dégradées ne possédant qu'un mannose 4 ou 4' terminal, où encore de structures ne possédant que l'antenne inférieure liée en α 1-6.

En revanche, les glycannes ne possédant que l'antenne supérieure ne présentent plus ce phénomène.

En effet, ici, la valeur du glissement chimique du groupement acétyl a repris sa valeur initiale ; quant au proton anomérique, son glissement chimique possède une valeur intermédiaire.

Cela veut dire que, dans l'interaction *Fuc-GlcNAc-2*, la présence du *Man* (α 1-6) est la condition nécessaire et suffisante. En effet, si l'on observe le schéma suivant :



H-1 GlcNAc-2		4,632	4,686	4,686	4,677	4,683	4,683	
								
								
								
								
								
NAc GlcNAc-2		2,070	2,091	2,095	2,072	2,093	2,093	
								
								
								
								
								

Valeurs des glissements chimiques de H-1 et NAc-CH₃ de GlcNAc-2
des différentes structures de glyco-asparagines

Tableau XI :



En l'absence de mannose ($\alpha 1-6$), le fucose possède un degré de liberté élevé relatif à la nature de la liaison 1-6.

L'interaction avec GlcNAc-2 est alors minimale.

Le mannose $\alpha 1-6$, qui possède également cette propriété, interagit avec ce fucose, en bloquant sa position dans l'espace.

Le fucose est alors rabattu sur le GlcNAc-2, ce qui conduit aux modifications du spectre R.M.N. décrites précédemment.

Si nous nous référons maintenant au modèle de la "*bird conformation*", proposée par MONTREUIL (Fig. 55, p.132), à laquelle nous rajoutons le résidu de fucose lié en ($\alpha 1-6$) sur GlcNAc-1, nous observons mieux le rôle joué par ce sucre. Les deux positions limites que prendrait le fucose dans l'espace sont représentées en "*surligné*". Le fucose permettrait donc d'arrimer l'antenne inférieure, comme l'avait suggéré MONTREUIL dans ce modèle de "*wing broken conformation*" (Fig. 56, p.133).

Les observations que nous venons d'énoncer permettent en plus de préciser que cette interaction fait intervenir uniquement Man-4', GlcNAc-2 et Fuc.

Une étude NoeSy permettrait de préciser le mode d'interaction entre ces 3 sucres, qui devrait se situer au niveau H-4, H-5 de Man-4'.

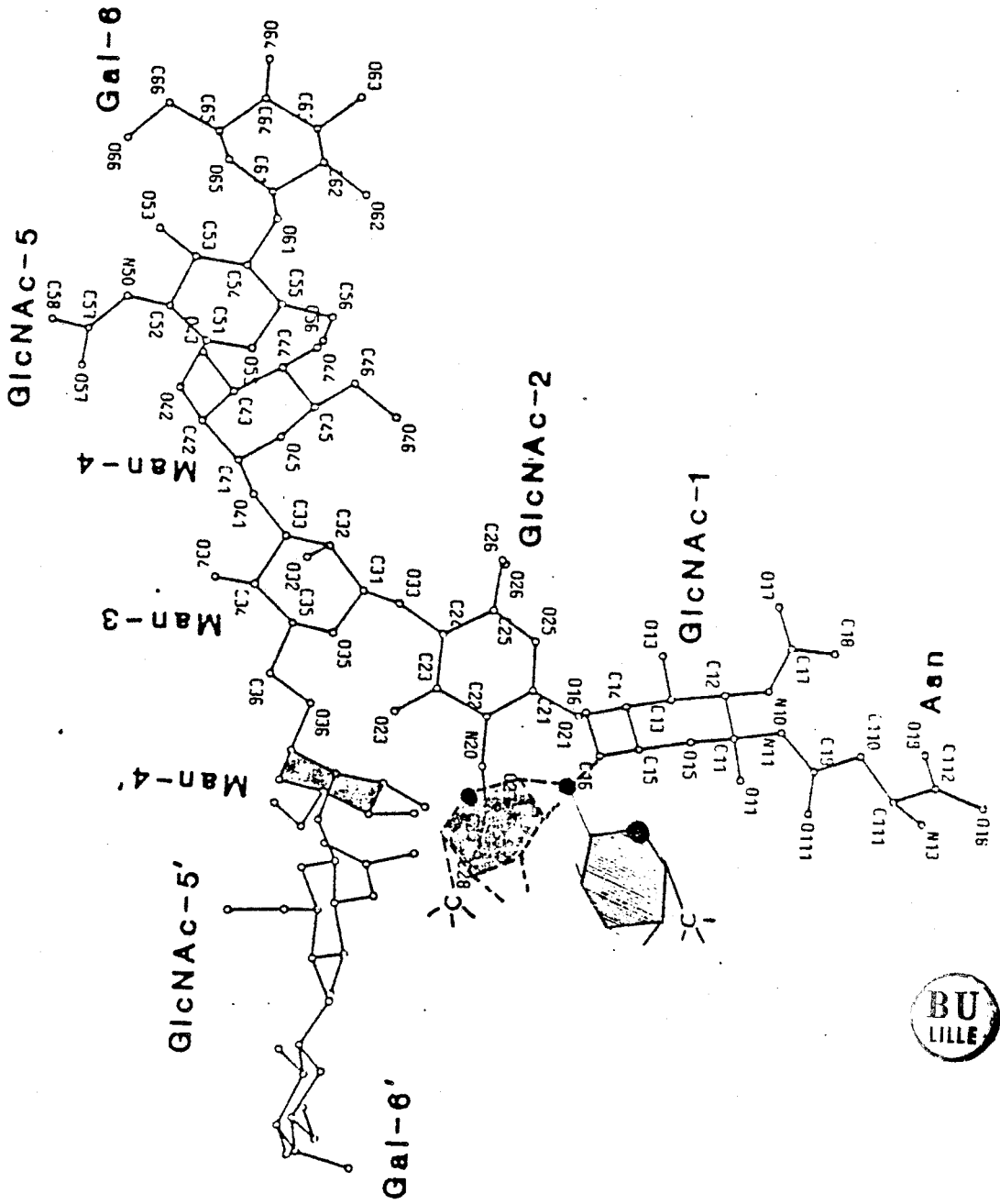
Signalons aussi que le rôle que nous attribuons ici au fucose serait susceptible d'expliquer l'inhibition de l'activité de l' $\alpha 1-6$ mannosidase, de même que l'affinité sélective de la lectine "*lens culinaris*" pour les glycanes bi-antennés fucosylés.

Enfin, au moment où nous avons dû arrêter nos travaux, nous étions sur le point d'isoler chaque fucoglyco-asparagine par C.L.H.P. sur C_{18} .

Récemment, chaque pic, isolé par C.L.H.P. sur colonne échangeuse d'anions, a été séparé en 5 ou 6 pics, en fonction de la liaison (1-2) ; (1-3) et (1-4) du fucose (Fig. 57, p.134).

En outre, une quarantaine de fucosides de masse moléculaire plus élevée sont en cours de fractionnement, toujours à l'aide de ces mêmes techniques.

Le Laboratoire disposera donc dans quelques mois d'une série homologue de près de 50 modèles fucosylés différents qui seront utilisés pour l'étude R.M.N. et l'interaction avec les lectines spécifiques du fucose.



Bird Conformation (MONTREUIL 16217)

Fig. 55 :

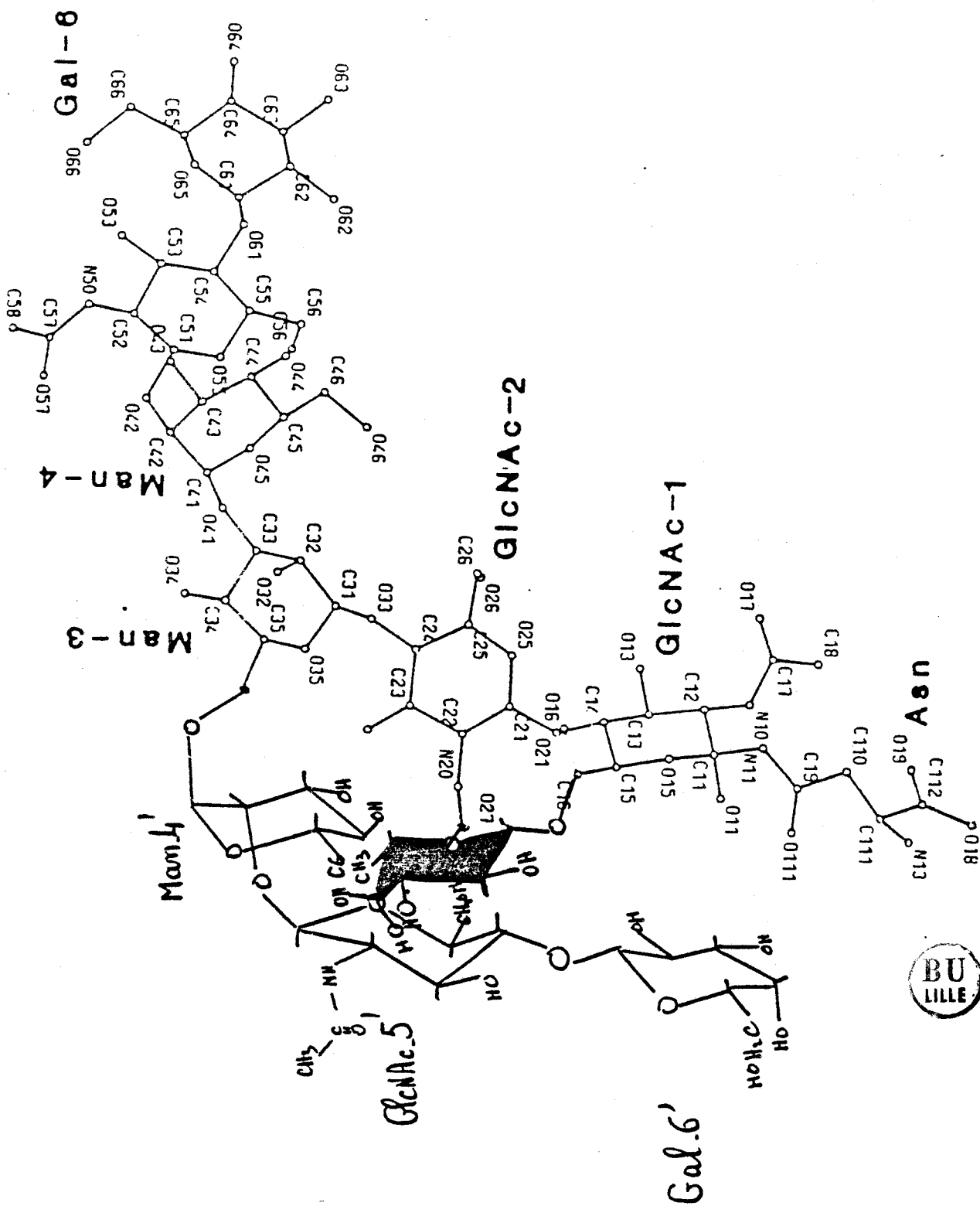
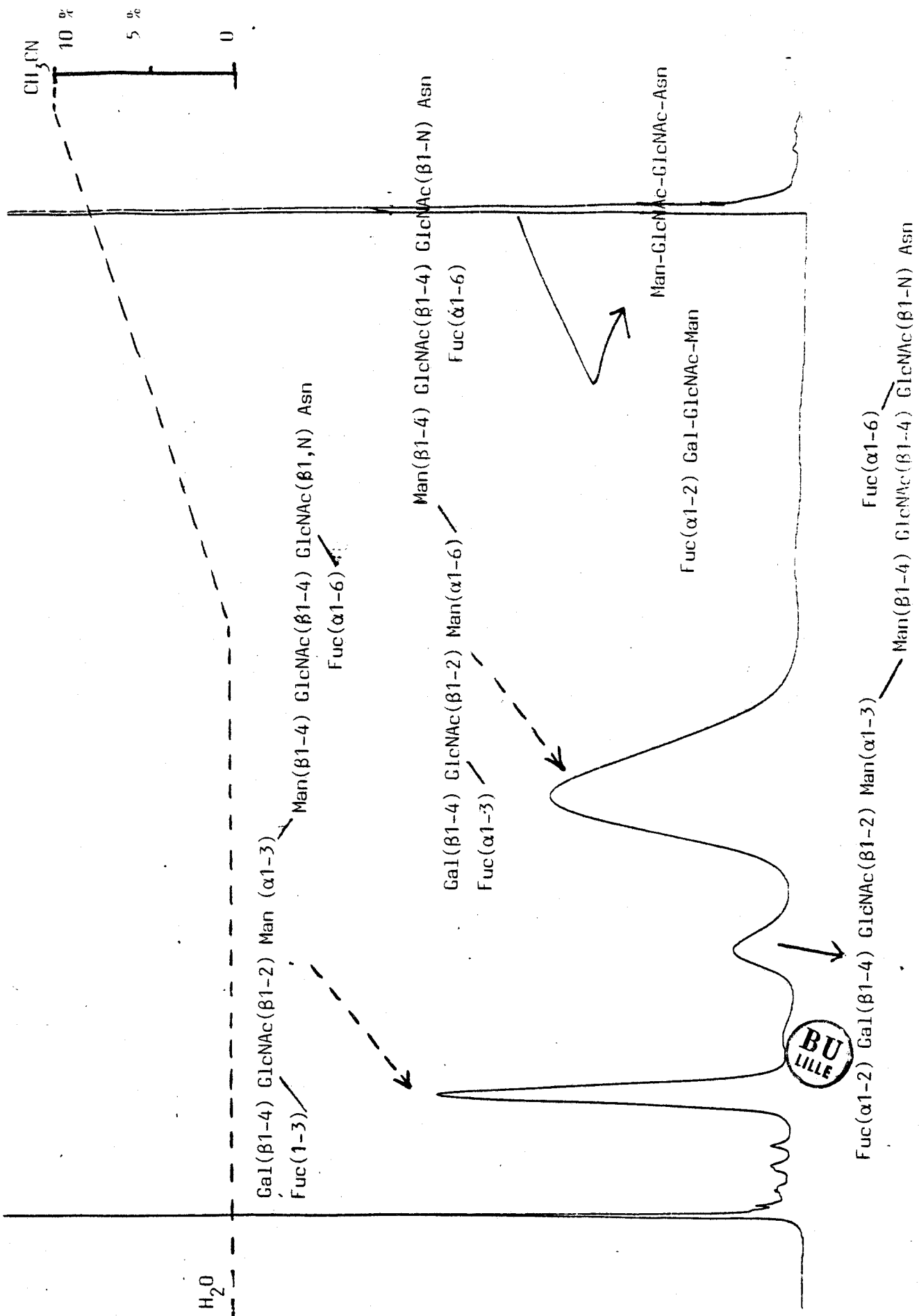


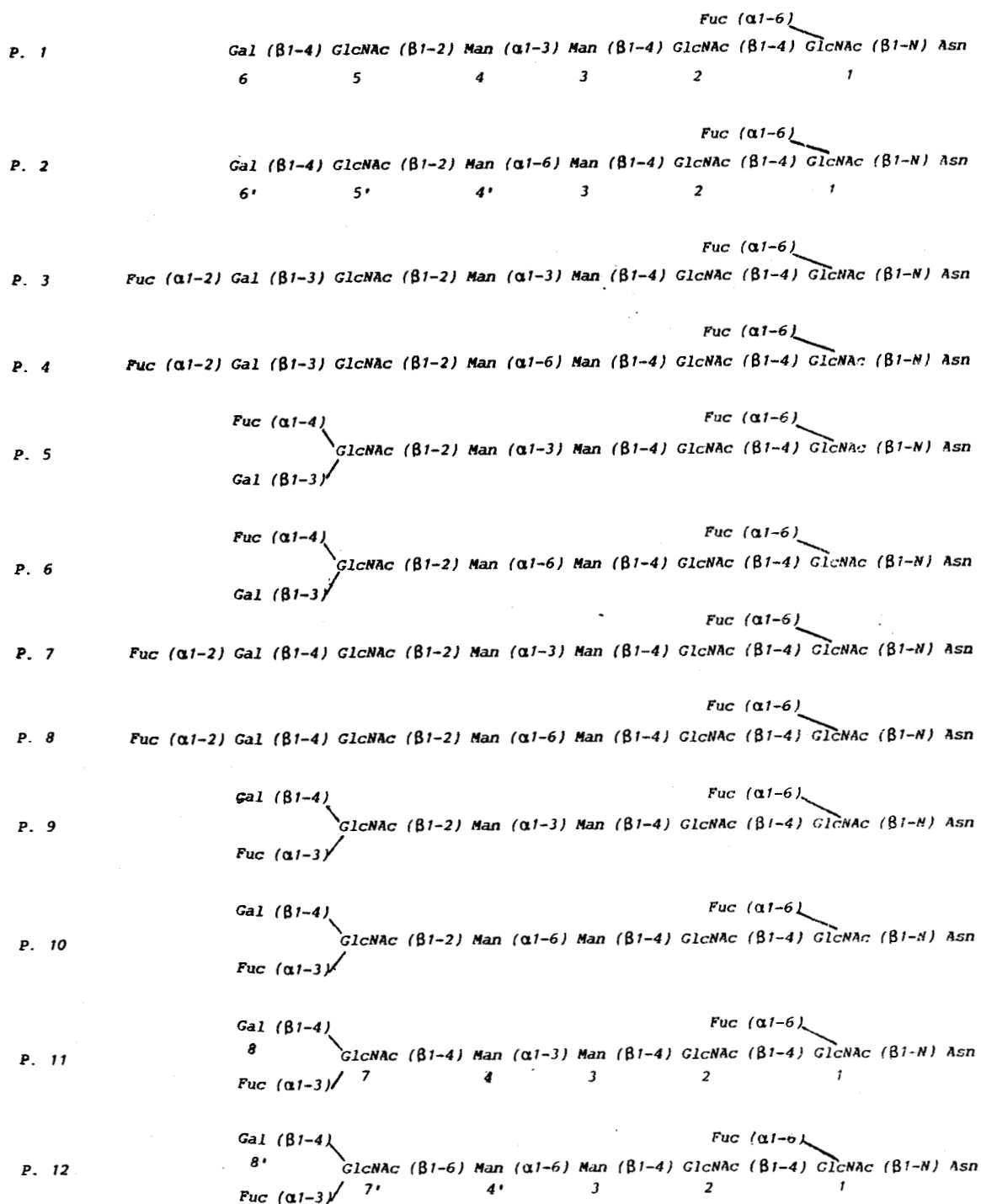
Fig. 56 :

"Broken wing" conformation (MONTREUIL (60))



Chromatographie Liquide Haute Pression de phase inverse sur colonne ODS-C₁₈

Fig. 57 :



Structure des glyco-asparagines isolés de l'urine de patients atteints de fucosidose



BIBLIOGRAPHIE

	Références	Pages
ABELEV G.I., PEROVA S.D., KHORAMKOVA N.I., POSTNIKOVA Z.A., IRLIN I.S. <i>Transplantation</i> , 1 (1963) 174	115	39
ALTEVOGT P., FOGEL M., CHEINGSONG-POPOV R., DENNIS J., ROBINSON P., SCHIRRMACHER V. <i>Cancer Res.</i> , 43 (1983) 5138-5144	141	53
ANTONOWICZ I., ISHIDA S., SHWACHMAN H. <i>Pediatrics</i> , 56 (1975) 782-787	11	3
BANWO O., VERSEY T., HOBBS J.R. <i>Lancet</i> , 1 (1974) 643-645	116	39
BAUSSANT T., Thèse de 3ème Cycle. Université des Sciences et Techniques de LILLE-FLANDRES-ARTOIS (Décembre 1985)	151	80
BENEDI V.J., ESCRIBANO M.J., ZUINGHEDAU J., BURTIN P. <i>Cancer Res.</i> , 44 (1984) 1135-1141	120	39
BERNARD N., ENGLER R., STRECKER G., MONTREUIL J., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G. <i>Glycoconjugate J.</i> , 1 (1984) 123-140	159	119
BERNARD V.K., LINDLARD F. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 171 (1956) 1443-1445	23	7
BLEDAY R., SONG J., WALKER E.S., SALCEDO B.F., THOMAS P., WILSON R.E., CHEN L.B. STEELE G. <i>Cancer</i> , 57 (1986) 433-440	88	29
BREMER E.G., LEVERY S.B., SONNINO S., GHIDONI R., CANEVARI S., KANNAGI R., HAKOMORI S.I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 14773-14777	72	26
BRISSON J.R., CARVER J.P. <i>Can. J. Biochem. Cell. Biol.</i> , 61 (1983) 1067-1078	136	49
BROCKHAUS M., MAGNANI J.L., HERLYN M., BLASZCZYK M., STEPHENSKI Z., KOPROWSKI M., GINSBURG V. <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 217 (1982) 647-651	52	21, 27
BRODIN T., HELLSTROM K.E., KARLSSON K.A., SJOGREN H.O., STROMBERG N., THURIN J. <i>B.B.A.</i> , 837 (1985) 349-353	126	42
BROWN A., FEIZI T., GOOI H.C., EMBLETON M.J., PICARD J.K., BALDWIN R.W. <i>Biosci. Report.</i> , 3 (1983) 163-170	85	29, 46
BUCK C.A., FUHRER J.P., SOSLAU G., WARREN L. <i>J. Biol. Chem.</i> , 249 (1974) 1541-1550	63	23

CHANDRASEKARAN E.V., DAVILA M., NIXON D.W., GOLDFARB M., MEDICINO J.F. J. Biol. Chem. 258 (1983) 7213-7222	56	22, 30
CHERESH D.A., VARKI A.P., VARKI N.M., STALLCUP W.B., LEVINE J., REISFELD R.A. J. Biol. Chem., 259 (1984) 7453-7459	144	54
CIVIN C., MIRRO J., BANQUE RIGO M.L. Blood, 57 (1982) 842-845	101	32
COTE R.H. "Blood and Tissue Antigens" [Aminoff D., ed.] 1970, pp 249-264, Academic Press London et NEW YORK	24	7
COTE R.H., VALET J.P. Biochem. J., 153 (1976) 63-73	19	5
DELANNOY P., DEBRAY H., MONTREUIL J. C.R. Acad. Sc. Paris, 301 (1985) 767-771	160	23
DIETERT R.R., HARTWEIL D.P., KLINE K., SANDERS B.G. Biochem. Genet., 22 (1984) 839-851	119	39
DORLAND L., SCHUT B.L., Vliegenthart J.F.G., STRECKER G., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., 73 (1977) 93-97	156	87
DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., Vliegenthart J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J. FEBS Lett., 77 (1977) 15-20	148	67
DURAND P., PHILIPPART M., BORRONEC C., DELLACELLA G. Minerva Pediat., 84 (1969) 160-166	145	55
EGGERMONT E. Biol. Neonat., 10 (1966) 266-280	10	3
FALK K.E., KARLSSON K.A., LARSON G., THURIN J., BLASZCZYK M., STEPLEWSKI Z., KOPROWSKI H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 110 (1983) 383-391	73	26
FEIZI T., KABAT E.A., VICARI G., ANDERSON B., MARSH W. J. Exp. Med., 133 (1971) 39-52	40	12
FEIZI T. Biochem. Soc. Trans., 12 (1984) 545-549	128	42, 46
FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H. Carbohydr. Res., 80 (1980) 336-339	153	87
FORSTER C.S., EDWARDS P.A., DINSDALE E.A., NEVILLE A.M. Virchows Arch., 394 (1982) 279-293	93	29

FOURNET B., STRECKER G., LEROY V., MONTREUIL J. <i>Anal. Biochem.</i> , 176 (1981) 489-502	155	87
FRASER D., CLAMP J.R. <i>Clin. Chim. Acta</i> , 59 (1979) 301-307	18	4
FRENCH J., NICHOLSON D.C., RIMINGTON C. <i>Biochem. J.</i> , 120 (1970) 393-397	27	7
FUKUDA M., SPOONER E., OATES J.E., DELL A., KLOCK J.C. <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 10925-10935	110	36
FUKUDA M.N., DELL A., OATES J.E., FUKUDA M. <i>J. Biol. Chem.</i> , 260 (1985) 6623-6631	64	23
FUKUDA M., BOTHNER B., RAMSAMOOJ P., DELL A., TILLER P.R., VARKI A., KLOCK J.C. <i>J. Biol. Chem.</i> , 260 (1985) 12957-12967	68	24, 42
FUKUDA M.N., DELL A., TILLER P.R., VARKI A., KLOCK J.C., FUKUDA M. <i>J. Biol. Chem.</i> , 261 (1986) 2376-2383	136	49
FUKUSHI Y., HAKOMORI S.I., SHEPARD T. <i>J. Exp. Med.</i> , 159 (1984) 506-520	124	42
FUKUSHI Y., HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., COCHRAN N. <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 4681-4685	74	26
FUKUSHI Y., NUDELMAN E., LEVERY S.B., HAKOMORI S.I., RAUVALA H. <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 10511-10517	75	26
FUKUSHI Y., NUDELMAN E., LEVERY S.B., HIGUSHI T., HAKOMORI S.I. <i>Biochemistry</i> , 25 (1986) 2859-2866	76	26
FUKUSHIMA K., HIROTA M., TERASAKI P.I., WAKISAKA A., TOGASHI H., CHIA D., SAYAMA N., FUKUSHI Y., NUDELMAN E., HAKOMORI S.I. <i>Cancer Res.</i> , 44 (1984) 5279-5285	87	29, 42
GLICK M.C., SANTER U. <i>In Cell Surface Carbohydrate Chemistry</i> (1978) HARMON R.E., 13-26	61	23
GOOI H.C., FEIZI T., KAPABIA A., KNOWLES B.B., SOLTER D., EVANS M.J. <i>Nature</i> , 292 (1981) 156-158	83	29, 39, 44
GOOI H.C., WILLIAMS L.K., UEMERA K., HOUNSELL E.F., MC. ILHINNEY R.A., FEIZI T. <i>Mol. Immunol.</i> , 20 (1983) 607-613	84	29, 30
GREEN M.N., SHWACHMAN H. <i>Pediatrics</i> , 41 (1968) 989-992	17	4
GUSTAFSSON J.A., STENBERG A. <i>Eur. J. Biochem.</i> 22 (1971) 246-256	29	9

HAKOMORI S.I., MURAKAMI W.T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 59 (1968) 254-261	43	18, 21
HAKOMORI S.I. B.B.A., 417 (1975) 55-89	45	20
HAKOMORI S.I. Ann. Rev. Biochem., 50 (1981) 733-764	42	16
HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S., SOLTER D., KNOWLES B.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100 (1981) 1578-1586	100	32
HAKOMORI S.I. Bull. Cancer, 70 (1983) 118-126	44	18
HAKOMORI S.I., KANNAGI R. J. Natl. Cancer Inst., 71 (1983) 231-251	123	40, 53
HAKOMORI S.I. Annu. Rev. Immunol., 2 (1984) 103-126	132	48
HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S.B., KANNAGI R. J. Biol. Chem., 259 (1984) 4672-4680	77	26
HALL I.C., O'TOOLE E. Am. J. Dis. Child, 47 (1934) 1279-1285	6	3
HANISCH F.G., UHLENBRUCK G. DIENST C. Eur. J. Biochem., 144 (1984) 467-474	130	47
HANISCH F.G., EGGE H., KATALINIC J.P., UHLENBURG G. FEBS Lett., 200 (1986) 42-46	109	46
HANSSON G.C., KARLSSON K.A., LARSON G., McKIBBIN J.M., BLASZCYK M., HERLYN M., STEPLEWSKI Z., KOPROWSKI H. J. Biol. Chem. 258 (1983) 4091-4097	129	47
HANSSON G.C., ZOPF D. J. Biol. Chem., 260 (1985) 9388-9392	139	51, 53
HERLANT-PEERS M.C., MONTREUIL J., STRECKER G., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VELDINIK G.A., VLIEGENTHART J.F.G. Eur. J. Biochem., 117 (1981) 291-300	34	12
HIRABAYASHI T., TAKI T., MATSUMOTO M., KOJIMA K. Biochem. Biophys. Acta., 529 (1978) 96-105	54	22
HIROTA M., FUKUSHIMA K., TERASHITA G.Y., KAWAMARA M., CHIA D., SUYAMA N., TOGASHI H. Cancer R., 45 (1985) 1901-1905	105	34
HIROTA M., FUKUSHIMA K., TERASAKI P.I., TERASHITA G.Y., GALTON J., KAWAHARA M. Cancer Res., 45 (1985) 6453-6456	104	34
HOLMES E.H., OSTRANDER G.K., HAKOMORI S.I. J. Biol. Chem., 259 (1984) 11208-11214	137	49

HOLMES E.H., OSTRANDER G.K., HAKOMORI S.I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 261 (1986) 3737-3743	127	42, 51
HOUNSELL E.F., FEIZI T. <i>Med. Biol.</i> , 60 (1982) 227-260	69	24
HOUNSELL E.F., LAWSON A.M., FEENEY J., GOOI H.C., PICKERING N.J., STOLL M.S., LUI C.L., FEIZI T. <i>Eur. J. Biochem.</i> , 148 (1985) 367-377	37	12, 80
HUANG L.C., BROCKHAUS M., MAGNANI J.L., CUTTITA S.R., MINNA J.D., GINSBURG V. <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 220 (1983) 318-320	102	34
IGURO T., WAKISAKA A., TERASAKI P.I., HIROTA M., SUYAMA N., FUKUSHIMA K., CHIA D., KAWAHARA M. <i>Lancet.</i> , 2 (1984) 817-818	97	30
ITO M., SUZUKI E., NAIKI M., SENDO F., ARAI S. <i>Int. J. Cancer</i> , 34 (1984) 689-697	78	26
IVATT R.J. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 78 (1981) 4021-4025	134	48
JOHNSON P.M., YATES A.D., WATKINS W.M. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 100 (1981) 1611-1618	138	49
KANNAGI R., LEVERY S.B., HAKOMORI S.I. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 80 (1983) 2844 - 2848	121	39
KARLSSON K.A., LARSON G. <i>FEBS Lett</i> , 87 (1978) 283-287	25	7, 10
KARLSSON K.A., LARSON G. <i>J. Biol. Chem.</i> , 254 (1979) 9311-9316	31	10
KARLSSON P. <i>in "Introduction to modern biochemistry"</i> 3ème ed. 1968, pp. 314, Academic Press, NEW YORK et LONDRES	12	3
KEENAN T.W., MORRE D.J. <i>Science</i> , 182 (1973) 935-937	47	20
KINSELLA R.A., FRANCIS F.E. <i>J. Clin. Endocrinol. Metab.</i> , 32 (1971) 801-818	3	2, 9
KNIEP B., MONNER D.A., BURRICHTER H., DIEHL V., MUHRALDT P.F. <i>J. Immunol.</i> , 131 (1983) 1591-1594	99	32
KOHLER G., MILSTEIN C. <i>Nature</i> , 256 (1975) 495-497	70	24
KOPITO L., SCHWACHMAN H. <i>J. Pediatr.</i> , 68 (1966) 313-314	7	3

KOPROWSKI H., STEPLENSKI Z., MITCHELL K., HERLYN D., FUHRER J.P. <i>Sonat. Cell. Genet.</i> , 5 (1979) 957-972	79	26, 29
KOPROWSKI H., HERLYN M., STEPLEWSKI Z., SEARS H.F. <i>Science</i> , 212 (1981) 53-54	80	26
LEE W.M., WESTRICK M.A., MACHER B.A. <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 10090-10095	46	20
LLOYD, MOMOI M., KENNETT R.H., GLICK M.C. <i>J. Biol. Chem.</i> , 255 (1980) 11914-11921	96	30, 34
LOTAN R., RAZ A. <i>Cancer Res.</i> , 43 (1983) 2088-2093	142	53
MAGNANI J.L., SMITH D.F., GINSBURG V. <i>Anal. Biochem.</i> , 109 (1980) 399-402	143	53
MAGNANI J.L., BROCKHAUS M., SMITH D.F. <i>Science</i> , 212 (1981) 55-56	53	21
MAGNANI J.L., NILSSON B., BROCKHAUS M., ZOPF D., STEPLEWSKI Z., KOPROWSKI H., GINSBURG V. <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 14365-14369	81	26,36,42,47
MAGNANI J.L., BALL E.D., FANGER M.W., HAKOMORI S.I., GINSBURG V. <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 223 (1984) 501-504	103	34
MARCUS D.M. <i>Molecular Immunology</i> , 21 (1984) 1083-1091	28	8
MARSH W.L. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 7 (1961) 200-209	89	29
MICHALSKI J.C., STRECKER G., VAN HALBECK H., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G. <i>Carbohydr. Res.</i> , 100 (1982) 351-363	149	75
MONTREUIL J. <i>Proc. Sharon Katzir-Katchalski conference on Carbohydrate- Protein Interactions Kibbutz Kiryat Anavim.</i> , 9 (1980) 3-4	162	132
MONTREUIL J., DEBRAY H., DEBEIRE P., DELANNOY P. <i>in H. Popper, W. Reutter, F. Gudat and E. Köttgen (eds) Falk Symposium 34 on Structural carbohydrates in the Liver pp 239-258, M.T.P. Press Lancaster (1983)</i>	60	23, 133
MURAMATSU H., MURAMATSU T. <i>FEBS Lett.</i> , 163 (1983) 181-184	106	34
NILSSON O., MANSSON J.E., TIBBLIN E., SVENNERHOLM L. <i>FEBS Lett.</i> , 133 (1981) 197-200	33	10
NUDELMAN E., HAKOMORI S.I., KANNAGI R., LEVERY S., YEH M.Y., HELLSTROM K.E., HELLSTROM I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 12752-12756	50	21, 26, 32
NUDELMAN E., KANNAGI R., HAKOMORI S.I., PARSONS M., LIPINSKI M., WIELS J., FELLOUS M. TURSZ T. <i>Science</i> , 220 (1983) 509-511	98	32

OGATA S.I., MURAMATSU T., KOBATA A. <i>Nature</i> , 259 (1979) 580-582	58	23, 24
OLDING L.B., THURIN J., SVALANDER C., KOPROWSKI H. <i>Int. J. Cancer</i> , 34 (1984) 187-192	107	34
PAZ PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. <i>Carbohydr. Res.</i> , 141 (1985) 41-47	154	87
PICARD J., FEIZI T. <i>Mol. Immunol.</i> , 20 (1983) 1215-1220	38	12
PICARD J., FEIZI T. <i>Biochem. Soc. Trans.</i> , 12 (1984) 653-655	39	12
PICARD J.K., WALDRON-EDWARD D., FEIZI T. <i>J. Clin. Lab. Immunol.</i> , 1 (1978) 119-128	90	29, 48
PIERCE R.J., SPIK G., MONTREUIL J. <i>Biochem. J.</i> , 180 (1979) 673-676	36	12
PIERCE-CRETEL A., PAMBLANCO M., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK G., VAN HALBEEK H., VLIENGENTHART J.F.G. <i>Eur. J. Biochem.</i> 125 (1982) 383-388	150	80
PRIEELS J.P., MONNON D., DOLMANS M., BEVER T.A., HILL R.L. <i>J. Biol. Chem.</i> , 256 (1981) 10456-10463	111	36
PRIETO P.A., SMITH D.F. <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 241 (1985) 281-289	26	7, 10
PRITCHARD J.A. <i>Obstet. Gynecol.</i> , 28 (1966) 606-610	2	2
PUKEL C.S., LLYOD K.O., TRAVASSOS L.R., DIPPOLD W.G., OETTGEN H.F., OLD L.J. <i>J. Exp. Med.</i> , 155 (1982) 1133-1147	49	20, 23, 32
RACE R.R., SANGER R. "Blood Groups in Man" (1968) chapitres 9, 10, Blakwell Scientific Publications, Oxford et Edinbourg	20	5
REAL F.X., MATTES M.J., HOUGHTON A.N., OETTGER H.F., LLYOD K.O., OLD L.J. <i>J. Exp. Med.</i> , 160 (1984) 1219-1233	114	38
ROVIS L., KABAT E.A., PEREIRA M.E.A., FEIZI T. <i>Biochemistry</i> , 12 (1973) 5355-5360	41	12
RULE A.H., BARAN D.T., SHWACHMAN H. <i>Pediatrics</i> , 45 (1970) 847-850	13	3
RULE A.H., LAWRENCE D., HAGER H.J., HYSLOP N.Jr., SHWACHMAN H. <i>Pediatrics</i> , 48 (1971) 601-604	14	3
RUMPOLD H., OBEXERAND G., KRAFT D. (1982) in "NK Cells and other natural effector cells" [HERBERMANN R.B. ed.] pp 47-52 Academic Press, New York	92	29

RYLEY H.C. in Dodge J.A., ed. "Topics in paediatric gastroenterology", pp 14-23, Pitman Medical Tunbridge Wells	16	4
RYLEY H.C., NEALE L., BROGAN T.D., BRAY P.T. Arch. Dis. Child., 49 (1974) 901-904	15	4
SANTER U.V., GLICK M.C., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G. Carbonhydr. Res., 120 (1983) 197-217	94	30, 38
SANTER U.V., GILBERT F., GLICK M.C. Cancer Res., 44 (1984) 3730-3735	67	24
SCANLIN T.F., MATAVIC S.S., PACE M., SANTER U.V., GLICK M.C. Biochem. Biophys. Res. Commun., 79 (1977) 879-875	66	24
SCHACHTER H., DIXON G.H. Can. J. Biochem., 43 (1965) 381-397	9	3
SCHUTT W.H., ISLES T.E. Arch. Dis. Child., 43 (1968) 178-181	5	2
SCHWARZ E. Ann. Paediatr., 181 (1953) 306-319	8	3
SHARP H.L., PELLER J., CAREY J.B.Jr., KRIVIT W. Pediatr. Res., 5 (1971) 274-279	30	9
SHEARES B.T., CARLSON D.M. J. Biol. Chem., 258 (1983) 9893-9898	112	36
SHI Z.R., Mc INTYRE L.J., KNOWLES B.B., SOLTER D., KIM Y.S. Cancer Res., 44 (1984) 1142-1145	125	42
SHIMANO T., LOOR R.M., PAPPIDERA L.D., KURIYAMA M., VINCENT R.G., NEMOTO T., HOLYORE E.D., BERJIAN R., DOUGLASS H.O., CHU T.M. Cancer, 47 (1981) 1602-1615	117	39
SIDDIQUI B., WHITEHEAD J.S., KIM Y.S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 2168-2175	48	20
SJOGREN H.O., HELLSTROM I., BANSAL S.C., WARNER G.A., HELLSTROM G. Int. J. Cancer, 9 (1972) 274-283	55	22
SMITH C.A. in "The physiology of the newborn infant", 3 rd ed., 1959, pp. 235-250, Blackwell Scientific Publications Oxford	4	2
SOLTER D., KNOWLES B.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) 5565-5569	86	29, 32
SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J. Arch. Intern. Physiol. Biochim., 82 (1974) 791-794	161	67
SPRINGER G.F., NAGAY V., TEGTMEYER H. Biochemistry, 5 (1966) 3254-3272	22	5

STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIENGENTHART J.F.G., DUBESSET D. <i>Biochimie</i> 60 (1968) 725-734	157	90
STRECKER G., PEERS M.C., MICHALSKI J.C., HONDI-ASSAH T., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., FARRIAUX J.P., MAROTEAUX P., DURAND P. <i>Eur. J. Biochem.</i> , 75 (1977) 391-403	35	12
STRECKER G., MONTREUIL J. <i>Biochimie</i> , 61 (1979) 1199-1246	152	80
SZKUDLAREK J., STEUDEN I., SALWA J., RADIKOWSKI G. <i>Arch. Immunol. Ther. Exp.</i> , 19 (1971) 789-799	118	39
SZULMAN A.E. <i>Curr. Top. Develop. Biol.</i> , 14 (1980) 127-145	131	48
TAKASAKI S., IKEHIRA H., KABATA A. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 92 (1980) 735-742	59	23
TSAY G.C., DAWSON G. <i>J. Neurol.</i> , 27 (1976) 733-740	146	55
URDAL D.L., HAKOMORI S.I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 258 (1983) 6869-6874	82	27
VAN HALBECK H., DORLAND L., VLIENGENTHART J.F.G. MONTREUIL J., FOURNET B., SCHMID K. <i>J. Biol. Chem.</i> , 256 (1981) 5588-5590	108	34
VLIENGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H. <i>Advance in carbohydrate Chemistry and Biochemistry</i> vol. 41, pp 209-374, Academic Press, London	147	62, 87 101, 108
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 69 (1972) 1838-1842	65	24
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A. <i>Fed. Proc.</i> , 32 (1973) 80-85	62	23
WARREN L., BUCK C.A., TUCZINSKI G.P. <i>Biochem. Biophys. Acta.</i> , 516 (1978) 91-127	57	22
WATANABE K., MATSUBARA T., HAKOMORI S.I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 251 (1976) 2385-2387	51	21
WATKINS W.M. <i>Biochem. Soc. Symp.</i> , 40 (1974) 117-124	32	10
WEINSTEIN J., DE SOUZA-E-SILVA U., PAULSON J.C. <i>J. Biol. Chem.</i> , 257 (1982) 13845-13853	113	36
WIELS J., HOLMES E.H., COCHRAN N., TURSZ T., HAKOMORI S.I. <i>J. Biol. Chem.</i> , 259 (1984) 14783-14787	133	48
WILLIAMS L.K., SULLIVAN A., Mc ILHINNEY R.A., NEVILLE A.M. <i>Int. J. Cancer</i> , 30 (1982) 731-738	91	29
WILLISON K.R., CRITCHLEY D.R., FISHMAN P.H., MOSS J. <i>J. Immunol.</i> , 129 (1982) 603-609	122	39

YANG H.Y., HAKOMORI S.I. J. Biol. Chem. 245 (1971) 1192-1200	95	30
YANG H.J., HAKOMORI S.I. J. Biol. Chem., 246 (1971) 1192-1200	71	26, 34
YOGESWARA G., SALK P.L. Science, 212 (1981) 1514-1516	140	53
YOUNG D.M., SCHWERT G.W., HARRIS J.S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99 (1958) 673-675	1	2
ZILLIKEN F., WERNER G.H., SILVER R.K., GYORKI P. Virology, 3 (1957) 464-474	21	5



RESUME

Le méconium de nouveau-né renferme des quantités élevées de matériel glucidique - glycoprotéines, glycopeptides et oligosaccharides - témoin de la biosynthèse et du catabolisme de constituants élaborés durant la vie foetale.

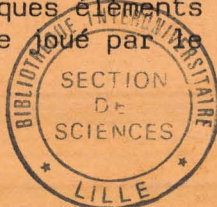
L'identité structurale des glycannes des néo-antigènes de la cellule cancéreuse et des glycoconjugués fucosylés d'origine foetale a été rapportée à de nombreuses reprises dans la littérature.

L'urine de patients atteints de fucosidose (maladie génétique due à un déficit en α -L-fucosidase lysosomique) constitue une autre source importante de fucosides.

Nous avons entrepris le fractionnement et l'étude structurale de 25 glyco-asparagines, isolés du méconium et de l'urine de fucosidose, qui dérivent tous du catabolisme de glycoprotéines fucosylées. Cette étude a été essentiellement réalisée par Résonance Magnétique Nucléaire du proton à 400 MHz.

Ces travaux ont conduit aux résultats suivants:

- 1- Nous avons précisé les paramètres R.M.N.-¹H de 18 nouvelles structures glycanniques.
- 2- L'étude des glyco-asparagines de l'urine de fucosidose a conduit à la caractérisation d'un nouveau type de liaison du fucose que nous décrivons ici pour la première fois chez l'homme.
- 3- L'étude comparée des 25 glyco-asparagines a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle le catabolisme des N-glycoprotéines s'effectue en deux étapes distinctes a) la protéolyse et la libération de glyco-asparagines b) l'action successive de la fucosidase, de l'aspartamidase, de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, puis des exoglycosidases.
- 4- Les glyco-asparagines fucosylés isolés du méconium ne portent pas de déterminants antigéniques de type onco-foetal défini à ce jour. En revanche, le méconium est riche en structures fucosylées au point d'attache possédant une N-acétylglucosamine intercalaire.
- 5- Nous avons pu apporter quelques éléments nouveaux sur la conformation des glycannes et sur le rôle joué par le résidu de fucose du point d'attache.



MOTS-CLES

Glyco-asparagine, N-glycane, structure primaire, urine, fucosidose, R.M.N. du proton à 400 MHz, méconium de nouveau-né, catabolisme