50376
1986
63

N° d'ordre : 687

50376
1986
63

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Philippe DEBEIRE

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DE N-GLYCOSYLPROTEINES NORMALES ET PATHOLOGIQUES

1 - Amélioration de la technique d'hydrazinolyse

2 - Structure primaire des glycannes de l'hémocyanine du scorpion **Androctonus australis**, du fibrinogène bovin, du facteur VIII/facteur de von Willebrand et d'IgM normales et de macroglobulinémie de Waldenström.

3 - Etude structurale des glycannes de type oligomannosidique de fibroblastes de Hamster normaux et transformés.

Exemplaire corrigé après la soutenance

Présentée le 9 Juin 1986 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :	J. MONTREUIL
Rapporteurs :	P. ROUSSEL G. STRECKER
Examinateurs :	G. ALBAGNAC B. FOURNET J.F.G. VLIEGENTHART

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

.../...

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

.../...

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démograph.
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

.../...

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL, Directeur du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Unité Associée au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure - fonction des constituants membranaires).

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Je voudrais vous exprimer ma plus profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant de diriger ce travail et en favorisant mon intégration dans l'Enseignement Supérieur. Ces années passées dans votre laboratoire m'ont permis de bénéficier de votre haute compétence scientifique, de votre dynamisme et de votre enthousiasme. Je voudrais également vous remercier de m'avoir donné cette chance inestimable de rencontrer un "environnement scientifique" aussi propice aux recherches que nous avons effectuées ; croyez en ma plus profonde reconnaissance et à mon plus respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur P. ROUSSEL,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de me faire profiter de votre haute compétence dans le domaine des glycoprotéines en jugeant ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur G. STRECKER, Directeur de Recherche au C.N.R.S.,

Ton exemple de chercheur passionné, tes qualités scientifiques et humaines, font que je suis très heureux que tu aies accepté de juger cette thèse. Je t'exprime mon amicale reconnaissance pour les précieux conseils que tu m'as donnés tout au long de ce travail.

A Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de Recherche à l'INRA,

Guy, depuis deux ans que tu as bien voulu m'accepter et m'intégrer dans ton laboratoire, tu as toujours su me "stimuler" pour la rédaction de cette thèse. Je t'en remercie vivement.

A Monsieur le Professeur B. FOURNET,

Bernard, ta haute compétence dans le domaine de la structure des glycannes des glycoprotéines font que je suis très honoré que tu juges cette thèse. Je profite également de l'occasion qui m'est donnée pour te remercier pour l'aide et les précieux conseils que tu m'as prodigués.

A Monsieur le Professeur J.F.G. VLIEGENTHART,

Je vous remercie vivement ainsi que tout votre groupe pour la diligence et l'efficacité avec lesquelles vous avez réalisé les analyses de R.M.N. Je suis très honoré que vous ayez bien voulu accepter de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à

Messieurs les Professeurs M. GOUDEMAND, E. MOCZAR et M. GOYFFON qui ont permis la réalisation de ces études,

Madame A. CAHOUR, Messieurs H. DEBRAY, P. DELANNOY, B. HOFLACK, B. SAMOR et H. VAN HALBEEK pour leur amicale et fructueuse collaboration,

Monsieur Y. LEROY pour son aide et ses précieux conseils dans les analyses de g.l.c. - m.s.,

Monsieur le Professeur A. VERBERT et Monsieur R. CACAN qui m'ont initié à la Recherche.

Je ne saurais terminer sans remercier tous ceux qui, à titre divers, m'ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il me soit aussi permis de remercier Martine PHILIPSON qui, avec bonne humeur, a réalisé la frappe et la mise en page de ce mémoire.

ABREVIATIONS

Asn	:	Asparagine
ConA	:	Lectine de Canavalia ensiformis
dpm	:	désintégration par minute
Dol	:	Dolichol
FvWf	:	Facteur de von Willebrand
FVIII	:	Facteur antihémophilique A
FVIII/vWf	:	Complexe formé par les facteurs VIII et von Willebrand
Fuc	:	L-Fucose
Gal	:	D-Galactose
GalNAc	:	N-acétyl-D-galactosamine
Glc UA	:	Acide-D-glucuronique
H.P.L.C.	:	Chromatographie liquide haute performance
IgM	:	Immunoglobuline M
Man	:	D-Mannose
α-Me.Glc	:	α-méthyl-D-glucoside
Neu Ac	:	Acide N-acétylneuraminique
Neu Gc	:	Acide N-glycolylneuraminique
R.M.N.	:	Résonnance magnétique nucléaire
Ser	:	L-sérine
Thr	:	L-Thréonine
T.L.C.	:	Chromatographie de couche mince
Xyl	:	D-xylose

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

CHAPITRE I : LES N- et O- GLYCOSYL PROTEINES ; DONNEES GENERALES SUR L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES. p. 9

I - LES O-GLYCOSYLPROTEINES. p. 9

A - GLYCANNES LIES A LA SERINE (THREONINE) p. 11

B - GLYCANNES LIES A L'HYDROXYPROLINE OU L'HYDROXYLYSINE p. 13

II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES. p. 15

A - LES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE p. 16

B - LES GLYCANNES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE p. 18

C - LES GLYCANNES DE TYPE MIXTE p. 21

III - CONCLUSIONS p. 21

CHAPITRE II : L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES : UN REFLET DE LEUR BIOSYNTHESE. p. 24

I - DEFINITION DES GLYCOSYLTRANSFERASES. p. 24

II - BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES. p. 24

A - LA SYNTHESE DU PRECURSEUR DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARIDE. p. 25

B - TRANSFERT EN BLOC DE L'OLIGOSACCHARIDE SUR LA PROTEINE. p. 28

C - MATURATION ET BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE. p. 29

D - SYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE HYBRIDE ET N-ACETYLLACTOSAMINIQUE ET ALLONGEMENT DES GLYCANNES. p. 29

III - CONCLUSIONS p. 31

CHAPITRE III : L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES : UN REFLET DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE. p. 33

I - ROLE DES GLYCANNES DANS LA CONFORMATION DES GLYCOPROTEINES. p. 34

II - EFFETS PROTECTEURS DES GLYCANNES ENVERS LA PROTEOLYSE NON SPECIFIQUE. p. 35

III - **LES GLYCANNES EN TANT QUE SIGNAUX DE RECONNAISSANCE.** p. 35

A - ROLE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES. p. 39

1 - En tant que déterminants antigéniques. p. 39

2 - En tant que récepteurs de virus et de bactéries. p. 39

3 - En tant que récepteurs de molécules solubles. p. 40

4 - Dans l'adhésion cellulaire. p. 41

5 - Dans le recyclage et le catabolisme des glycoprotéines membranaires. p. 42

B - ROLE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DES LIQUIDES BIOLOGIQUES. p. 43

1 - Rôle des glycannes dans le transport et l'excrétion des glycoprotéines solubles. p. 43

2 - Les glycannes des glycoprotéines circulantes sont des signaux de reconnaissance destinés à des cellules cibles. p. 46

IV - **CONCLUSIONS.** p. 46

CHAPITRE IV : MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNE. p. 48

I - **DONNEES GENERALES SUR LES MODIFICATIONS AFFECTANT LES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE LORS DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE.** p. 48

II - **MODIFICATIONS DES STRUCTURES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DE SURFACE LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNE DES CELLULES.** p. 49

A - L'AUGMENTATION DE LA TAILLE DES GLYCANNES : UN MARQUEUR DE LA TUMORIGENICITE, MAIS NON SPECIFIQUE. p. 49

B - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOPEPTIDES DE LA FRACTION A ET B DES CELLULES NORMALES ET TRANSFORMEES. p. 53

C - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOPEPTIDES DE LA FRACTION C DES CELLULES NORMALES ET TRANSFORMEES. p. 56

III - **CONCLUSIONS.** p. 58

CHAPITRE V : CONCLUSIONS. p. 60

TRAVAUX PERSONNELS.

MATERIEL ET METHODES.

I - **CHOIX DE LA METHODE DE LIBERATION DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLGLYCOPROTEINES : L'HYDRAZINOLYSE.** p. 61

A - PRINCIPE. p. 62

B - MODE OPERATOIRE. p. 62

II - **FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES ISSUS DE L'HYDRAZINOLYSE/N-REACETYLATION.** p. 63

A - SEPARATION EN FONCTION DE LEURS CHARGES. p. 63

1 - Electrophorèse haut voltage sur papier. p. 64

2 - Chromatographie d'échanges d'anions. p. 64

B - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE CON A - SEPHAROSE 4B. p. 65

C - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE. p. 66

1 - Sur couche mince. p. 66

2 - Sur papier. p. 67

3 - Par H.P.L.C. p. 67

III - **METHODOLOGIE D'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES.** p. 67

A - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES. p. 67

B - COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES. p. 68

C - CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES. p. 68

D - METHYLATION DES GLYCANNES. p. 69

E - RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE. p. 69

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DU GLYCANNE DE L'HEMOCYANINE DU SCORPION ANDROCTONUS AUSTRALIS. p. 70

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES MAJEURS DU FIBRINOGENE BOVIN. p. 87

ETUDE DES GLYCANNES DU COMPLEXE FACTEUR VIII/ FACTEUR DE VON WILLEBRAND. p. 94

I - **INTRODUCTION.** p. 94

II - MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DU FVIII/vWf. p. 97

III - DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DU GLYCANNE MAJEUR DE TYPE N-GLYCOSIDIQUE DU FVIII/vWf. p. 109

IV - LES GLYCANNES MINEURS DE TYPE N-GLYCOSIDIQUE DU FVIII/vWf. p. 115

V - CONCLUSIONS. p. 120

ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES IgM NORMALES ET DE MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTROM. p. 121

ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE DE FIBROBLASTES DE HAMSTER NORMAUX ET TRANSFORMES. p. 136

I - MATERIEL ET METHODES. p. 138

A - MATERIEL p. 138

B - METHODES p. 138

1 - Conditions de culture cellulaire et de marquage métabolique. p. 138

2 - Préparation des glycopeptides oligomannosidiques. p. 139

3 - Préparation des oligosaccharides de type oligomannosidique. p. 140

4 - Fractionnement des oligosaccharides de type oligomannosidique. p. 141

5 - Digestion des oligosaccharides de type oligomannosidique par l'α-mannosidase de la fève Jack. p. 141

II - RESULTATS ET DISCUSSION. p. 142

A - FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES MARQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR CONA-SEPHAROSE 4B. p. 142

B - FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES DE TYPE OLIGO-MANNOSIDIQUE LIBERES PAR L'ENDO-ß-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE H. p. 145

1 - Glycopeptides marqués sur la glucosamine. p. 145

2 - Glycopeptides marqués par le D- 2-^{3}H mannose. p. 146

III - CONCLUSIONS. p. 154

CONCLUSIONS GENERALES p. 157

INTRODUCTION

Les glucides ont été pendant longtemps considérés uniquement comme des substances de soutien ou de réserve énergétique et ce n'est que depuis une quinzaine d'années que de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées aux glycoconjugués, composés résultant de la liaison covalente d'une fraction glucidique appelée : glycanne et d'une protéine (glycoprotéine) ou d'un lipide (glycolipide). Ces composés ont rapidement acquis une importance aussi grande que les acides nucléiques ou les protéines, notamment grâce d'abord à quelques Scientifiques qui ont concentré leurs recherches sur l'étude structurale de leur copule glucidique. En effet, ce n'est que par la connaissance de la structure primaire des glycannes que l'on a pu comprendre leur métabolisme, leur rôle dans de nombreux phénomènes biologiques, leur pathologie et ainsi établir les bases d'une Biologie Moléculaire des glycoconjugués.

La glycosylation des protéines est un phénomène universel puisque les glycoprotéines sont présentes chez les animaux, les plantes et les microorganismes. La signification biologique des glycannes demeura longtemps inconnue jusqu'aux années 1970 où différentes équipes de chercheurs dégagèrent le concept "glycannes, signaux de reconnaissance" et constatèrent que la structure de ces derniers pouvait être modifiée dans les cellules cancéreuses. Une bonne compréhension de ces phénomènes ne pouvait passer que par la connaissance des structures primaires des glycannes nécessitant une méthodologie spécifique, fiable et sensible.

Ce mémoire rapporte l'essentiel des travaux que, sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, nous avons effectués dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217). Ils s'inscrivent dans la ligne de recherches poursuivies depuis une vingtaine d'années dans ce laboratoire et consacrées à l'étude des relations structure-fonction des glycannes des glycoprotéines. La tâche majeure qui nous a été confiée était d'appliquer une méthode de libération sélective des glycannes, l'hydrazinolyse, à des

N-glycosylprotéines d'origines diverses et de mettre au point différentes méthodes d'isolement des glycannes ainsi libérés. L'objectif était d'établir de véritables cartes chromatographiques en vue de miniaturiser les techniques afin de pouvoir les appliquer à des glycoprotéines présentant un intérêt biologique majeur mais disponibles seulement en faibles quantités et/ou présentant une grande hétérogénéité structurale des glycannes. Disposant de cet acquis méthodologique nous pouvions alors aborder l'étude fine des structures glycanniques des glycoprotéines des cellules cancéreuses.

Nos travaux s'inscrivent en outre dans un vaste plan de recherches entreprises au laboratoire dans le domaine de la Biochimie Comparée en vue de répondre à la question : "les glycannes sont-ils des marqueurs de l'évolution ?" et de jeter les bases de la génétique des glycosyltransférases.

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous rappellerons l'état actuel de nos connaissances sur la structure, la biosynthèse, le rôle des glycannes des glycoprotéines ainsi que les modifications structurales qui les affectent lors de la transformation maligne des cellules.

Nos recherches sur les déterminations de structure des glycannes ont fait l'objet des 9 publications suivantes, les travaux rapportés dans ce mémoire correspondant principalement aux publications 1, 3, 4, 6, 7, 8 et 9.

1.- B. SAMOR, C. MAZURIER et M. GOUDEMAND
P. DEBEIRE, B. FOURNET et J. MONTREUIL
Preliminary results on the carbohydrate moiety of factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/vWf)
Thromb. Res., 25 (1982) 81-89

2.- B. HOFLACK, P. DEBEIRE, R. CACAN, J. MONTREUIL et A. VERBERT
Dolichol dependent synthesis of N, N'-diacetylchitobiosyl proteins and their further mannosylation : a second route for glycosylation of proteins in rat-spleen lymphocytes.
Eur. J. Biochem., 124 (1982) 527-531

3.- P. DEBEIRE, J. MONTREUIL, B. SAMOR, C. MAZURIER, M. GOUDEMAND, H. VAN HALBEEK et J.F.G. VLIEGENTHART
Structure determination of the major asparagine-linked sugar chain of humain factor VIII-Von Willebrand factor
FEBS Lett., 151 (1983) 22-26

4.- A CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN et J. MONTREUIL
Comparative study of the carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M
Biochem. J., 211 (1983) 55-63

5.- J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE et P. DELANNOY
Lectins as oligosaccharide receptors
1983, in Structural carbohydrate in the liver,
Falk Symposium n° 34
H. POPPER, W. REUTTER, F. GUDAT and E. KOTTGEN (Eds),
MTP Press Ltd, Lancaster, 239-258

6.- A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN, J. MONTREUIL
H. VAN HALBEEK et J.F.G. VLIEGENTHART
Primary structure of the major glycans of the N-acetyllactosamine type derived from the human immunoglobulins M from two patients with Waldenström's macroglobulinemia.
FEBS Lett., 170 (1984) 343-349

7.- A. CAHOUR, P. DEBEIRE, J. PAZ-PARENTE, L. HARTMANN et J. MONTREUIL
Structural basis of the heterogeneity of asparagine-linked oligosaccharides of a Waldenström's macroglobulinemia immunoglobulin M.
Biochim. Biophys. Acta, 802 (1985) 188-196

8.- P. DEBEIRE, J. MONTREUIL, E. MOCZAR, H. VAN HALBEEK et J.F.G. VLIEGENTHART
Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen
Eur. J. Biochem., 151 (1985) 607-611

9.- P. DEBEIRE, J. MONTREUIL, M. GOYFFON, A.J. VAN KUIK, H. VAN HALBEEK et J.F.G. VLIEGENTHART
Primary structure of the oligosaccharide moiety of the Scorpion Androctonus australis hemocyanin
Carbohydr. Res. (1985) (sous presse)

En outre, les communications suivantes ont été présentées dans des réunions scientifiques :

1.- A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN et J. MONTREUIL
Etude comparative des chaînes glycanniques des IgM humaines normales et pathologiques. Hétérogénéité et différences structurales
Xème Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Paris, 5-7 juillet 1982.

2.- B. HOFLACK, P. DEBEIRE, R. CACAN., J. MONTREUIL et A. VERBERT
Mannosylation of chitobiosyl protein may represent a second route for the N-glycosylation of protein
1st European Congress on cell biology, Paris, 18-23 juillet 1982

3.- H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE et J. MONTREUIL
Isolation and caracterisation of glycopeptides from virus-transformed baby Hamster kidney fibrobalsts (BHK cells)
1st European Congress on Cell Biology, Paris, 18-23 Jully 1982, Biology of the cell, 45 (1982) 303
11th International Carbohydrate Symposium, Vancouver, 22-28 August 1982

4.- C. MAZURIER, B. SAMOR, M. GOUDEMAND, P. DEBEIRE, B. FOURNET et J. MONTREUIL
Structural studies on carbohydrate moiety of factor VIII/Von Willebrand factor.
International Congress ISH-ISBT, Budapest, 1-7 August 1982

5.- C. MAZURIER, B. SAMOR, P. DEBEIRE, M. GOUDEMAND et J. MONTREUIL
Chemical characterization of the carbohydrate moeity of human factor VIII/Von Willebrand factor
Symposium on factor VIII/von Willebrand factor, San Diego, 7-9 October 1982

6.- H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE et J. MONTREUIL
Isolation and characterization of glycopeptides from virus transformed baby hamster kidney fibroblasts (BHK cells)
Proceeding of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Roneby, July 1983, 172

7.- P. DELANNOY, P. DEBEIRE, J. MONTREUIL et H. DEBRAY
Comparison of glycan structures of fibronectin released by normal and virus-transformed baby hamster kidney 21 fibroblasts.
Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Roneby, July 1983, 173.

8.- A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN et J. MONTREUIL
Comparative study of carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M
Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Roneby, July 1983, 183

GENERALITES

Les glycoprotéines forment, avec les glycolipides la classe des glycoconjugués, composés résultant de l'association covalente d'une copule glucidique, le glycanne, avec une protéine ou un lipide. On trouve des glycoprotéines chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes du règne végétal et du règne animal, ainsi que chez les virus. La glycosylation des protéines est donc un phénomène universel et la question majeure qui se pose à leur égard concerne leur rôle biologique.

En 1952, MORGAN et WATKINS (se reporter à la revue de WATKINS -1-) avaient montré que les antigènes des groupes sanguins A, B, O étaient de nature glucidique. En 1960, GOTTSCHALK (-2-) avait identifié le récepteur érythrocytaire du virus de l'influenza, l'acide sialique. Les sucres étaient donc plus que des substances énergétiques et les concepts d'antigène et de récepteur de nature glucidique étaient nés. Mais, il a fallu attendre les années 1967-1969 pour qu'apparaissent les première preuves de la participation des glycannes dans les phénomènes cellulaires. En 1963, AUB et al. (-3-) puis, en 1967, BURGER et GOLDBERG (-4-) et en 1969, INBAR et SACHS (-5-) montrèrent qu'il existait des différences profondes d'agglutinabilité par des lectines entre des cellules normales et cancéreuses. Enfin, en 1968, le groupe d'ASHWELL, (voir la revue d'ASHWELL et MORELL -6-) démontra que la désialylation des glycoprotéines circulantes provoquait leur disparition du sang par un mécanisme de capture hépatique mettant en jeu des lectines membranaires.

Mais il était clair que la compréhension des rôles biologiques et du métabolisme des glycannes nécessitait la détermination de leurs structures primaires, à condition de disposer de méthodologies adaptées (voir la revue de MONTREUIL -7-). La première structure d'un trisaccharide lié O-glycosidiquement à la protéine (voir p.10) a été déterminée en 1950, à partir de mucines (GOTTSCHALK et GRAHAM -8-) et il fallut attendre les années 1970 pour que les premières structures complètes d'oligosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine

(voir p.15) soient publiées : glycanne de la taka-amylase par YAMAGUCHI et al. en 1971 (-9-), glycanne de la sérotransferrine humaine par SPIK et al. en 1973 (-10-).

En ce qui concerne les glycannes des N-glycosylprotéines on dénombre actuellement plus d'une centaine de structures différentes, dérivant d'un pentasaccharide commun invariant substitué par diverses structures glycosidiques porteuses de l'activité biologique (MONTREUIL -11-). La signification biologique de cette grande diversité de structures est la question fondamentale à laquelle nous essaierons de répondre à travers les données récentes de la littérature. La découverte d'un mécanisme biosynthétique commun d'élaboration de ces glycannes se compliquant au fur et à mesure de l'évolution des êtres vivants, les fonctions biologiques attribuables à ces glycannes, sont autant de preuves de la nécessité biologique de cette grande hétérogénéité.

Enfin, nous étudierons, dans le dernier chapitre, les modifications fines des structures glycanniques des glycoprotéines cellulaires accompagnant la transformation maligne des cellules qui pourraient expliquer certaines des propriétés nouvelles acquises par les membranes des cellules cancéreuses et qui affectent profondément leur comportement social.

CHAPITRE I

LES N- ET O-GLYCOSYL PROTEINES ; DONNEES GENERALES SUR L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES.

Après avoir rappelé la classification des glycannes des glycoprotéines, nous présenterons des exemples des différents types de structures glycanniques en orientant notre étude plus particulièrement vers les glycannes de type N-glycosidique (pour une classification complète, voir la revue de MONTREUIL -12-). A la lumière de l'hétérogénéité structurale existant dans le monde vivant, nous tenterons de dégager la notion de marqueur glycannique de l'évolution.

On rencontre deux types de liaison glycanne-protéine dans les glycoprotéines :

1 - les liaisons de type O-glycosidique.
2 - les liaisons de type N-glycosidique.

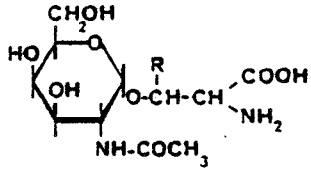
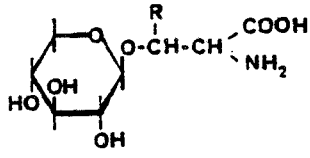
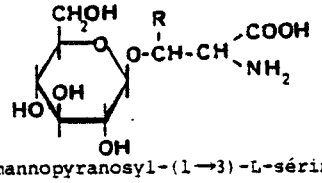
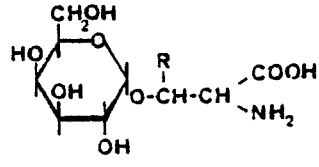
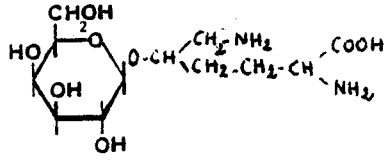
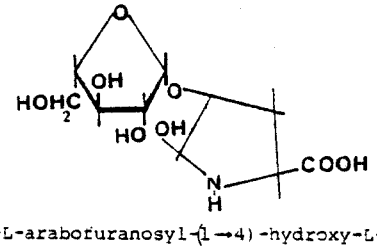
Ces deux types de liaisons conduisent à classer les glycoprotéines en O-glycosylprotéines, N-glycosylprotéines et N,O-glycosylprotéines, cette dernière classe étant porteuse des glycannes des deux types.

I - LES O-GLYCOSYLPROTEINES.

Les O-glycosylprotéines résultent de la conjugaison par une liaison O-glycosidique d'un monosaccharide (la N-acétylgalactosamine, le xylose, le galactose, le mannose ou l'arabinose étant le plus fréquemment rencontrés) à un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine, hydroxyproline, hydroxylysine, tyrosine). Comme le montre le Tableau I (p.10), cinq types de liaisons permettent de séparer les O-glycosyl-

TABLEAU I

LES DIFFERENTS TYPES DE LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

LIAISONS	ORIGINES	REFERENCES
 2-Acétamido-2-déoxy-O-α-D-galactopyranosyl-(1→3)-L-sérine (R=H) ou -L-thréonine (R=CH_3)	Glycoprotéines du règne animal (voir Tableau II, p.12)	
 O-β-D-Xylopyranosyl-(1→3)-L-sérine* (R=H) ou -L-thréonine** (R=CH_3)	* Mucopolysaccharides acides **Glycoprotéines d'algue rouge	Voir les revues de RODEN -13- HASCALL -14- HEANEY-KIERAS -15-
 O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)-L-sérine (R=H) ou -L-thréonine (R=CH_3)	Mannoprotéines de Saccharomyces cerevisiae Collagène de la cuticule de Nereis	NAKAJIMA et BALLOU -16- SPIRO et BHOYROO -17-
 O-α-D-galactopyranosyl-(1→3)-L-sérine	Extensine de tomate Lectine de pomme de terre	LAMPORT -18- ALLEN -19-
 O-β-D-galactopyranosyl-(1→5)-hydroxyl-L-lysine	Tropocollagène de Cobaye	SPIRO -20-
 O-β-L-arabofuranosyl-(1→4)-hydroxy-L-proline	Cellules de tabac (parois) Lectine de pomme de terre	AKIYAMA et KATO -21- ALLEN -22-

BU LILLE

protéines en deux sous-groupes suivant que le glycanne est lié à un ß-hydroxy-amino-acide (sérine ou thréonine) ou à des amino acides non ß-hydroxylés (hydroxyproline, hydroxylysine, tyrosine).

A - GLYCANNES LIES A LA SERINE (THREONINE).

Comme nous l'indique le Tableau I (p.10), quatre sucres sont impliqués dans la liaison avec la sérine ou la thréonine. C'est au cours des années 1962-1963 que différentes équipes de chercheurs ont démontré l'existence d'une liaison alcali-labile entre la N-acétylgalactosamine et la sérine ou la thréonine dans les mucines salivaires (HASHIMOTO et PIGMAN -23-, TANAKA et al. -24-). Ce type de liaison est abondamment rencontré dans les glycoprotéines animales et la partie glycannique soit linéaire, soit branchée peut ne comporter qu'un seul monosaccharide, la N-acétylgalactosamine, dans le cas des érythrocytes Tn réactifs (DAHR et al. -25-) ou, à l'inverse, jusqu'à une vingtaine de monosaccharides comme dans les déterminants de groupes sanguins (LLOYD et KABAT -26-). Le plus souvent, dans ce type de structure O-glycosidique, on retrouve le disaccharide du point d'attache Gal(ß1-3)GalNAc . Quelques exemples de glycannes de type O-glycosidique sont donnés dans le Tableau II (p.12). Il est important de noter que les monosaccharides habituellement rencontrés dans ce type de glycanne sont la N-acétylgalactosamine, le galactose, les acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques, le fucose et parfois la N-acétylglucosamine, mais jamais le mannose. Ce dernier point constitue une différence fondamentale entre les glycannes des O- et des N-glycosylprotéines animales.

La N-acétylgalactosamine peut être liée à la sérine (thréonine) par une liaison de type ß. C'est le cas des kératanes sulfates squelettaux, mais la liaison O-glycosidique la plus communément retrouvée dans les protéoglycannes est la liaison xylose-

TABLEAU II

EXEMPLES DE GLYCANNES LIES A LA PROTEINE PAR DES LIAISONS DU TYPE GalNAc(α1-3)Ser(Thr)

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCES
GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes Tn-réactifs	DAHR et al. -27-
Gal(ß1-3)GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes T-réactifs	-id-
Gal(ß1-3) / NeuAc(α2-6) → GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycoproteine de cerveau de Rat	FINNE -28-
NeuAc(α2-3)Gal(ß1-3) / NeuAc(α2-6) → GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycophorine Humaine (groupe M)	THOMAS et WINZLER -29-
NeuAc(α2-3)Gal(ß1-3) / NeuAc(α2-3)Gal(ß1-4)GlcNAc(ß1-6) → GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycoprotéine plaquettaire Humaine	TSUJI et al. -30-
lNAc(ß1-4) / euGl(α2-3) → GalNAc(ß1-3) Gal (ß1-4) Gal (ß1-3) / NeuGl(α2-8)NeuGl(α2-8)NeuGlc(α2-6) → GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycoprotéines d'oeufs de Truite	IWASAKI et al. -31-
Gal(ß1-3)GlcNAc(ß1-3) / Gal(ß1-4) / Fuc(α1-3) → GlcNAc(ß1-6) → Gal(ß1-3)GlcNAc(ß1-3)Gal(ß1-3)GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Immunoglobuline A du lait de Femme	CRETEL et al. -32-
[GlcNAc(ß1-3) / NeuAc(α2-6) → Gal(ß1-4)]n GalNAc(ß1-3) / NeuAc(α2-6) → GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycoprotéine sous-linguale de Rat	SLOMIANY et SLOMIANY -33-

BU LILLE

sérine (voir les revues de RODEN -34- et HASCALL -35-). On trouve ces protéoglycannes dans la plupart des tissus des Mammifères et particulièrement dans le tissu conjonctif. Leur partie oligosaccharidique est constituée d'un polymère linéaire souvent sulfaté, composé d'unités de répétition d'acide uronique (D-glucuronique ou L-iduronique) et d'hexosamine (glucosamine ou galactosamine, N-acétylées ou sulfatées). Différents exemples de ces structures sont décrits dans la Figure 1 (p.14).

C'est essentiellement dans le règne végétal et, pour le règne animal, chez les Invertébrés que l'on rencontre des liaisons O-glycosidiques entre la sérine (thréonine) et le galactose ou le mannose. Les glycannes sont des di-ou trisaccharides comme dans le cas du collagène de la cuticule de *Nereis* (SPIRO et BHOYROO -36-), ou au maximum des tétrasaccharides dans les mannoprotéines excrétées par *Saccharomyces cerevisiae* (NAKAJIMA et BALLOU -37-) (voir Figure 2 ; p.14).

B - GLYCANNES LIES A L'HYDROXYPROLINE OU L'HYDROXYLYSINE.

La découverte d'une liaison entre le galactose et l'hydroxylysine est à porter à l'actif de BUTTLER et CUNNINGHAM (-38-) et de SPIRO (-39-), qui ont mis en évidence ce type de liaison dans le tropocollagène de cobaye et dans les glycoprotéines des membranes basales glomérulaires bovines. Les liaisons faisant intervenir l'hydroxyproline et le galactose ou l'arabinose n'ont été trouvées que dans le règne végétal, qu'il s'agisse de glycoprotéines solubles ou de parois (MILLER *et al.* -40-, FINCHER *et al.* -41-).

```
                                  So3
                                   |6
NeuAc(α2-3) [Gal(ß1-4)GlcNAc(ß1-3)]n   Gal(ß1-4)GlcNAc(ß1-6)
                                                            \
                                                             GalNAc(ß1-3)Ser(Thr)   A
                                                            /
                                       NeuAc(α2-3)Gal (ß1-3)

        [GlcUA(ß1-3)GalNAc(ß1-4)]n GlcUA(ß1-3)Gal(ß1-3)Gal(ß1-4)Xyl(ß1-3)Ser   B
                                    |4
                                   So3
```

Figure 1 - EXEMPLES DE STRUCTURES DE GLYCANNES LIES O-GLYCOSIDIQUEMENT A LA SERINE (ou THREONINE) RETROUVES DANS LES PROTEOGLYCANNES (HASCALL -42-)

A - Kératane sulfate squelettal
B - Chondroïtine sulfate cartilagineux, n = 12 à 20

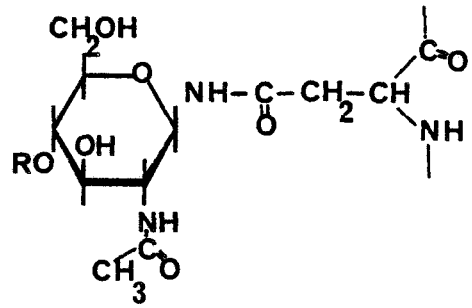
```
                GlcUA(α1-6)Man(α/ß1-3)Ser(Thr)  ]
                                                ]A
          Gal(α1-2)Gal(α1-2)Gal(α 1-3) Ser(Thr) ]

Man(α1-2)Man(α1-3)Man(α1-2)Man(α/ß1-3) Ser(Thr)   B
```

Figure 2 - EXEMPLES DE STRUCTURES DE GLYCANNES LIES O-GLYCOSIDIQUEMENT A LA SERINE (ou THREONINE) PAR LE GALACTOSE ET LE MANNOSE

A - Glycannes du collagène de la cuticule de Nereis (SPIRO et BHOYROO -43-)
B - Glycanne des mannoprotéines de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> (NAKAJIMA et BALLOU -44-)

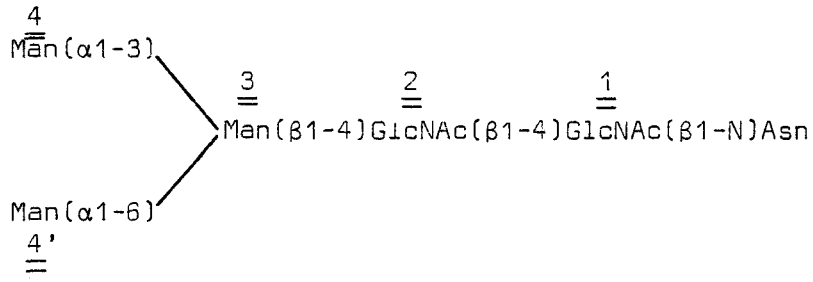
II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES.

A l'exception du chaînon asparagine-glucose récemment mis en évidence dans la glycoprotéine majeure de l'enveloppe d'une Archébactérie halophile (WIELANDT et al. -45-), la seule liaison de type N-glycosidique présente dans les glycoprotéines et protéoglycannes, implique la N-acétylglucosamine et l'asparagine. A la différence des liaisons de type O-glycosidique, cette liaison résulte de la condensation de la N-acétylglucosamine et de l'asparagine en une glycosylamine :



Ce type de liaison a été démontré conjointement par différentes équipes de chercheurs : MARSHALL et NEUBERGER (FLETCHER et al. -46-), NUENKE et CUNNINGHAM (-47-), YAMASHINA et MAKINO (-48-).

Tous ces glycannes possèdent une structure pentasacharidique commune : le mannotriosido - di - N-acétylchitobiose lié à un résidu d'asparagine de la protéine. Cette structure, placée en position "interne" dans la molécule de glycanne, est le trait d'union entre la protéine et la fraction spécifique et variable des glycannes. Elle est désignée sous le vocable de "noyau" ou d' "inner-core" :



Les monosaccharides pouvant substituer le noyau pentasaccharidique sont les suivants : le galactose, le mannose, la N-acétylglucosamine, le fucose, les acides neuraminiques (N-acétyl, N-glycolyl), le glucose et la N-acétylgalactosamine.

On distingue trois types de glycannes selon MONTREUIL (-49-,-50-) :

1 - le type oligomannosidique ("high-mannose glycans") : sur le noyau pentasaccharidique viennent s'ajouter des résidus d'α-mannose ;

2 - le type N-acétyllactosaminique ("complex glycans") : sur le noyau pentasaccharidique se greffent, en nombre variable, des résidus de N-acétyllactosamine [Gal(ß1-4)GlcNAc], de galactose , de fucose, d'acides sialiques, et parfois de N-acétylgalactosamine ;

3 - le type mixte ("hybrid type") possèdant à la fois des motifs structuraux appartenant aux deux types précédents.

A - LES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE.

Cette classe de composés est homogène et la variance de ces structures dépend du nombre de mannoses qui substituent le noyau pentasaccharidique commun. Le Tableau III (p.17) décrit les différentes structures de type oligomannosidique trouvées jusqu'à présent. Ces structures dérivent de la structure "limite" à 9 mannoses par délétion successive d'un résidu de mannose pour aboutir à la structure comportant 5 mannoses. Les glycannes possèdant 6, 7 et 8 mannoses possèdent plusieurs isomères qui ont été en partie retrouvés dans les

TABLEAU III

EXEMPLES DE STRUCTURES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCES
Man(α1-2) Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-2) Man(α1-6)	Cellules ovariennes de Hamster chinois	LI et KORNFELD -51-
Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-2) Man(α1-6)	Immunoglobuline M de macroglobulinémie de Waldenström	CHAPMAN et KORNFELD -52-
Man(α1-2) Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-6)	Lactotransferrine de Vache	VAN HALBEEK et al. -53-
Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-6)	Ovalbumine de Poule	CONCHIE et STRACHAN -54-
Man(α1-3) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-6)	Taka amylase	TAI et al. -55-
Man(α1-3) Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-3) Man(α1-6)	Ovalbumine de Caille	HASE et al. -56-
Man(α1-3) Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6)	Ovomucoïde de Poule	YAMASHITA et al. -57-
Glc(α1-2) Glc(α1-2) Glc(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-2) Man(α1-6)	Glycoprotéine de la membrane de la larve du moustique Aedes aegyptii	BUTTERS et HUGHES -58-
Man(α1-2) Man(α1-2) Man(α1-3) Man(α1-3) Man(α1-3) — Man(β1-4) GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-6) Man(α1-3) Man(α1-2) Man(α1-6)	Carboxypeptidase de Saccharomyces cerevisiae	HASHIMOTO et al. -59-

BU LILLE

immunoglobulines M monoclonales (CHAPMAN et KORNFELD -60-). Toutes ces structures sont des intermédiaires de la biosynthèse des glycannes des glycoprotéines qui sera traitée dans le chapitre II (p.24).

Des glycannes ne possédant que 3 ou 4 résidus de mannose ont été trouvés chez les Oiseaux et un autre mécanisme de biosynthèse des glycoprotéines a été proposé (voir chapitre II ; p. 24).

Nous avons représenté, en outre, dans le Tableau III (p.17), l'oligosaccharide précurseur des glycannes oligomannosidiques, possèdant trois résidus de glucose supplémentaires et qui a été retrouvé dans la glycoprotéine membranaire majeure d'une larve de moustique (BUTTERS et HUGHES -61-) et dans les immunoglobulines G (MELLIS et BAEZINGER -62-), ainsi qu'un glycanne à 13 mannoses isolé des mannoprotéines de Saccharomyces cerevisiae, ces glycannes pouvant comporter jusqu'à 150 résidus de mannose (BALLOU -63-).

B - LES GLYCANNES DE TYPE N-ACETYL LACTOSAMINIQUE.

(voir Tableau IV ; p.19 et 20)

Une première hétérogenéité de ces glycannes résulte de la substitution des mannoses 4 et 4' (se reporter à la numérotation de la p.15) du noyau pentasaccharidique par 1 à 6 résidus de N-acétyllactosamine conduisant aux glycannes mono-, bi-, tri-, tétra-, penta- et hexaantennés, le terme d'antenne ayant été proposé par MONTREUIL (-64-). En plus de cette variabilité structurale due au nombre d'antennes, un autre type de variabilité vient s'ajouter selon :

1 - les substitutions des N-acétyllactosamines par des résidus de galactose, d'acides sialiques, de fucose, de N-acétylglucosamine, de N-acétylgalactosamine, dans le cas des structures de type poly-N-acétyllactosaminique et N-acétyllactosaminique ;

TABLEAU IV

EXEMPLES DE STRUCTURES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE

STRUCTURE	ORIGINE	REFERENCES
Biantennée		
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) \ Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn / Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	Immunoglobuline G du colostrum de Veau	CHERON et al. -65-
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) \ Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn / NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	Serotransferrine Humaine	SPIK et al. -66-
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) GlcNAc(β1-4) —— Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn / NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) | (α1-6) Fuc	Immunoglobuline G sérique Humaine	BAEZINGER et al. -67-
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) \ Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn / Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) | (α1-6) Fuc | (α1-3) Fuc	Immunoglobuline de sécrétion du lait de Femme	PIERCE-CRETEL et al. -68-
Triantennée		
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) \ Man(α1-3) / NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) \ Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn / NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	Fétuine de Veau	NILSSON et al. -69-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) \ Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N) Asn \ Man(α1-6) / NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-6) / NeuAc(α2-6)	Facteur IX bovin	MIZUOCHI et al. -70-

STRUCTURE	ORIGINE	REFERENCES
Triantennée (suite) GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) GlcNAc(β1-2) Glc NAc(β1-4)—Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)	Ovotransferrine de Poule	SPIK et al. -71-
Tétraantennée Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Man(α1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	Asialo orosomucoïde Humain	FOURNET et al. -72-
Gal(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) Gal(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Neu Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) (α1-6) Man(α1-6) Fuc Neu Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Poly-N-acétyllactosaminique	Glycoprotéines de membrane plasmique de Thymocytes de Veau	YOSHIMA et al. -73-
GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) GlcNAc(β1-2) GlcNAc(β1-4)—Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn GlcNAc(β1-2) Man(α1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	Ovomucoïde de Poule	YAMASHITA et al. -74-
Pentaantennée Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) GlcNAc(β1-4)—Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4)—Man(α1-6) Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	Ovomucoïde de Tourterelle	FRANCOIS-GERARD et al. -75-

BU LILLE

2 - la présence d'une N-acétylglucosamine "intercalaire" ("bisecting" ou "intersecting" GlcNAc), substituant le mannose 3 et d'un résidu de fucose sur la N-acétylglucosamine 1 ;

3 - le degré de "maturation" des glycannes qui peuvent porter des antennes incomplètes réduites à un résidu de N-acétylglucosamine comme dans le cas de l'ovotransferrine de poule (SPIK et al. -76-, DORLAND et al. -77-).

C - LES GLYCANNES DE TYPE MIXTE.

Ce type de glycanne renfermant à la fois une structure de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique a été identifié d'abord dans l'ovalbumine (TAI et al. -78-), puis dans les immunoglobulines myélomateuses humaines (CHAPMAN et KORNFELD -79-), ainsi que dans la rhodopsine (LIANG et al. -80-). Le Tableau V (p.22) présente quelques exemples de ce type de structure.

III - CONCLUSIONS.

Nous venons de donner un aperçu de la très grande hétérogénéité structurale des glycoprotéines du monde vivant. En ce qui concerne les glycannes des N-glycosylprotéines, qui font plus particulièrement l'objet de nos études, on peut remarquer que l'on retrouve les structures de type oligomannosidique à tous les niveaux de l'évolution tandis que les structures de type hybride sont surtout présentes chez les Oiseaux et les structures de type N-acétyllactosaminique chez les Vertébrés.

TABLEAU V

EXEMPLES DE STRUCTURES DE TYPE MIXTE

STRUCTURE	ORIGINE	REFERENCES
GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6)	Rhodopsine bovine	LIANG et al. -81-
GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Man(α1-3) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-6) Man(α1-6)	Immunoglobuline M myélomateuse Humaine	CHAPMAN et KORNFELD -82-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Man(α1-3) GlcNAc(β1-2) GlcNAc(β1-4) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn Man(α1-3) Man(α1-6) Man(α1-6)	Ovalbumine de Poule	YAMASHITA et al. -83-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) 4Man(α1-3) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn SO_3 Man(α1-6) 4Man(α1-6)	Ovalbumine de Poule	YAMASHITA et al. -84-

BU LILLE

En ce qui concerne les Mammifères, les glycoprotéines des liquides biologiques ne contiennent que des oligosaccharides de type N-acétyllactosaminique, tandis que les glycoprotéines membranaires comportent à la fois des oligosaccharides de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. Néanmoins, il existe quelques exceptions à cette règle, et on ne peut la généraliser. La lactotransferrine bovine (VAN HALBEEK et al. -85-), les immunoglobulines M (CHAPMAN ET KORNFELD. -86-) contiennent des oligomannosides et la glycophorine, glycoprotéine majeure de la membrane de l'hématie humaine, ne comporte qu'un glycanne de type N-acétyllactosaminique (YOSHIMA et al. -87-).

Dans le chapitre suivant, nous rappellerons que tous les glycannes de type N-glycosidique possèdent des voies de biosynthèse communes et que leur hétérogénéité est liée aux mécanismes mêmes de la biosynthèse et à leur régulation.

CHAPITRE II
L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES : UN REFLET DE LEUR BIOSYNTHESE.

I - DEFINITION DES GLYCOSYLTRANSFERASES.

(voir les revues de MONTREUIL -88-, SCHACHTER et ROSEMAN -89-)

Les glycosyltransférases sont des enzymes chargées de transférer des oses sur des accepteurs très variés. La réaction générale s'écrit de la façon suivante :

Glycosyl-nucléotide + Accepteur ----→ Accepteur glycosylé + nucléotide

Les glycosyltransférases, largement répandues dans le monde vivant, montrent des maxima d'activité vis-à-vis du pH, de la température et de la force ionique au voisinage des valeurs physiologiques et le bon fonctionnement de ces enzymes nécessite, en génèral, la présence de cations divalents, le manganèse et le magnésium, en particulier. Ces enzymes montrent une très grande spécificité pour le sucre précurseur et pour le type de liaison dont elle catalysera la synthèse et le concept "une liaison glycosidique - une glycosyltransférase" semble, à présent, fermement établi.

II - BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES.

La biosynthèse des glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines, bien que nécessitant une suite de réactions plus complexe

que la biosynthèse des oligosaccharides de type O-glycosidique, est mieux connue et peut se subdiviser en quatre étapes :

1 - Synthèse du précurseur dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide.

2 - Transfert en bloc de l'oligosaccharide sur la protéine.

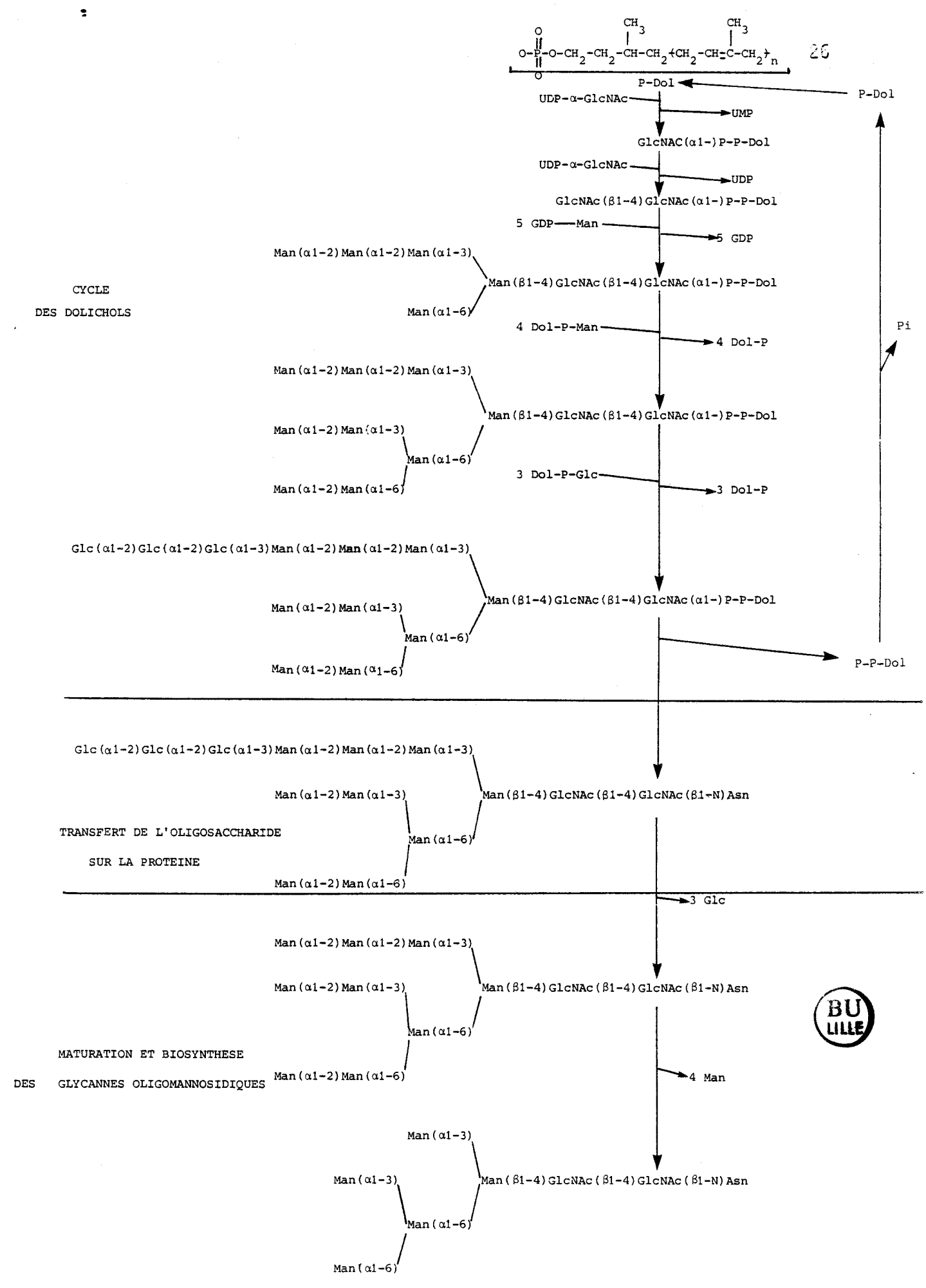
3 - Maturation et biosynthèse des glycannes de type oligomannosidique.

4 - Synthèse des glycannes de type hybride et N-acétyl-lactosaminique et allongement des glycannes.

Ces différentes étapes sont schématisées dans les Figures 3 et 4 (p.26 et 27).

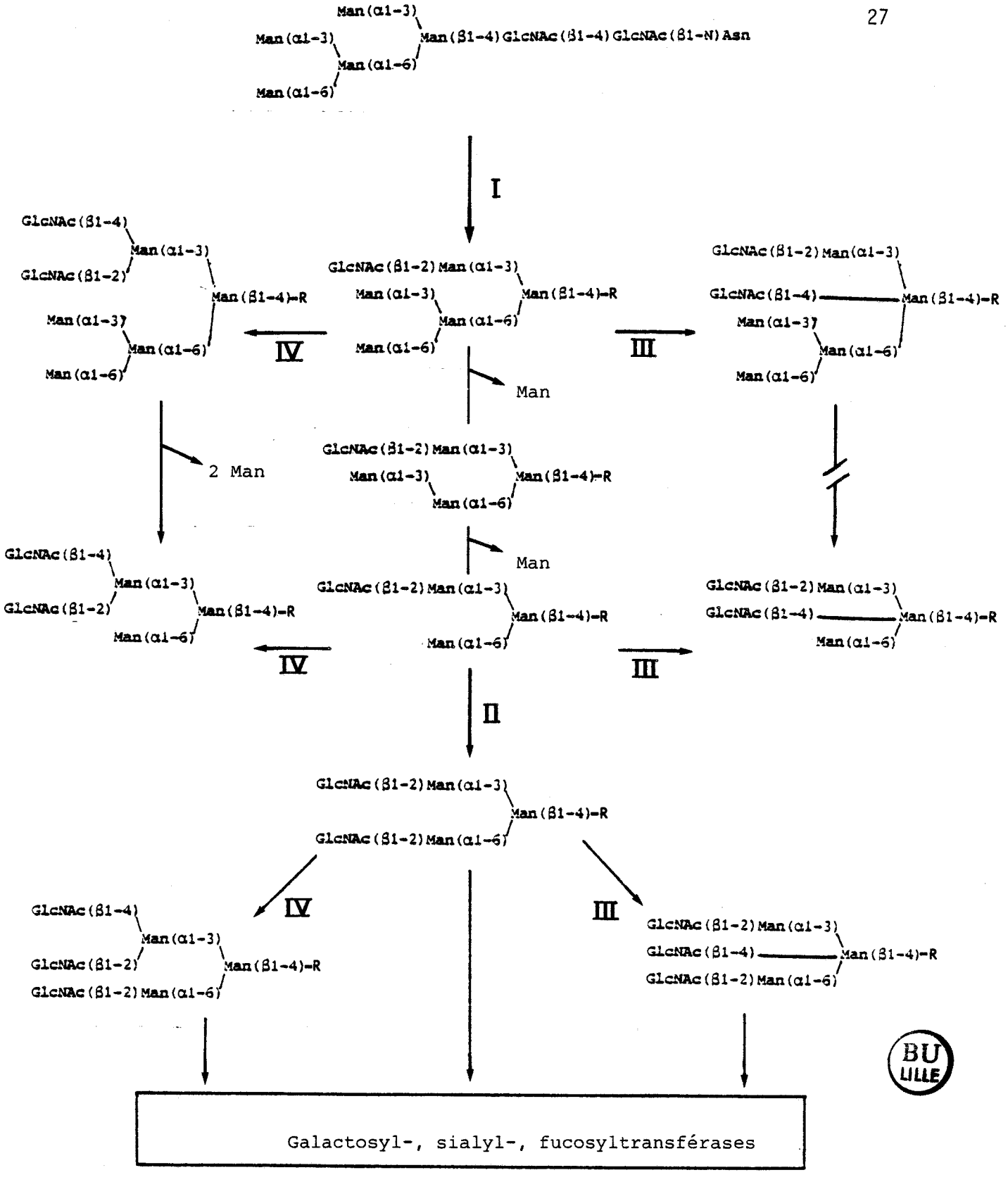
A - LA SYNTHESE DU PRECURSEUR DOLICHOL - PYROPHOSPHATE - OLIGOSACCHARIDE.

La première étape de la synthèse de l'oligosaccharide lié au dolichol comprend l'addition de deux résidus de N-acétylglucosamine à partir d'UDP N-acétylglucosamine sur le dolichol pour conduire à la formation de $(GlcNAc)_2$-P-P- Dol (ELBEIN -90-). Des additions successives de cinq mannoses à partir de GDP-mannose, puis de quatre mannoses à partir de dolichol-phosphate-mannose vont conduire à l'élaboration du glycanne Man_9 $GlcNAc_2$P-P-Dol (CHAPMAN et al. -91-) complété par l'addition de 3 résidus de glucose à partir de dolichol-phosphate-glucose (STANELONI et al. -92-).



BU LILLE

Figure 3 - Biosynthèse des glycannes des N-glycosylproteines: synthèse du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide et transfert sur la protéine suivis des étapes de maturation; synthèse des glycannes de type oligomannosidique.



BU LILLE

Figure 4 - Synthèse des glycannes de type mixte et N-acétyllactosaminique. R = $(GlcNAc)_2$Asn ; I, II, III et IV : N-acétylglucosaminyltransférases I, II, III et IV. (D'après SCHACHTER et al. -93-).

Cette synthèse de Glc_3 Man_9 $GlcNAc_2$-P-P-Dol est réalisée dans le reticulum endoplasmique rugueux. Dans le cas particulier des lymphocytes, elle s'effectue en outre à la surface de la cellule (CACAN et al. -94-).

B - TRANSFERT EN BLOC DE L'OLIGOSACCHARIDE SUR LA PROTEINE.

La formation des oligosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine commence par le transfert en bloc du Glc_3 Man_9 $GlcNAc_2$ aux résidus d'asparagine de la chaîne polypeptidique naissante sous l'action d'une oligosaccharide transférase.

Il est actuellement établi que la N-glycosylation ne peut avoir lieu que si le résidu d'asparagine accepteur est situé dans une séquence tripeptidique code : Asn-X-Ser (Thr), appelé séquon (MARSHALL et NEUBERGER -95-), située elle-même dans un coude ß (AUBERT et al. -96-, BEELEY -97-) .

Ce transfert apparaît donc comme un phénomène cotranslationnel et a lieu dans la lumière du reticulum endoplasmique rugueux (voir les revues de HANOVER et LENNARZ -98-, MONTREUIL -99-).

Un autre système de transfert et de synthèse de N-glycosylprotéines a été démontré par HOFLACK et al. (-100-). L'oligosaccharidyl transférase serait capable, in vitro, de transférer du N,N'-diacétylchitobiose directement sur la protéine à partir du dolichol-pyrophosphate-chitobiose, auquel succèderait un allongement du glycanne par l'addition de mannose provenant de GDP-mannose.

C - MATURATION ET BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE.

Les glucosidases I et II du reticulum endoplasmique rugueux libèrent les 3 résidus de glucose de l'oligosaccharide et le convertissent en Man_9 $GlcNAc_2$ (GRINNA et ROBBINS -101-). La néoglycoprotéine sera ensuite transportée vers la région proximale de l'appareil de Golgi où sous l'action d'une α-mannosidase, de un à quatre résidus de mannose pourront être enlevés, conduisant ainsi aux différentes structures de type oligomannosidique décrites dans le Tableau III de la p.17 (TULSIANI et al. -102-, OPHEIM et TOUSTER -103-). Il faut néanmoins remarquer que BISCHOPP et KORNFELD (-104-) ont montré l'existence d'une α-mannosidase au niveau du reticulum endoplasmique dont le rôle exact dans la maturation des glycannes est inconnu. Dans l'appareil de GOLGI, la plupart des oligosaccharides liés N-glycosidiquement ne restera pas sous la forme oligomannosidique, mais sera convertie en glycannes de type mixte et surtout de type N-acétyllactosaminique. Ce point capital de régulation sera discuté dans les conclusions de ce chapitre (p. 31).

D - SYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE HYBRIDE ET N-ACETYLLACTOSAMINIQUE ET ALLONGEMENT DES GLYCANNES.

La synthèse de ces deux types de glycannes est sous la dépendance de la N-acétylglucosaminyltransférase I, responsable de la synthèse du GlcNAc Man_5 $GlcNAc_2$ qui est le substrat préférentiel des α-1,6 et α-1,3 mannosidases golgiennes catalysant la formation de GlcNAc Man_4 $GlcNAc_2$ et GlcNAc Man_3 $GlcNAc_2$ (TABAS et KORNFELD -105-, HARPAZ et SCHACHTER -106-) (voir Figure 4 ; p.27). C'est à ce stade de la maturation que se différencient les voies biosynthétiques conduisant aux glycannes de type mixte et de type N-acétyllactosaminique.

En effet, différentes N-acétylglucosaminyltransférases catalyseront l'addition de résidus de N-acétylglucosamine aux motifs GlcNAc Man_5 $GlcNAc_2$, GlcNAc Man_4 $GlcNAc_2$ et GlcNAc Man_3 $GlcNAc_2$ pour former des glycannes de type mixte ou N-acétyllactosaminique (SCHACHTER et al. -107-) (voir Figure 4; p. 27).

TULSIANI et TOUSTER (-108-) ont également montré que le blocage des α-mannosidases golgiennes par un inhibiteur, la swainsonine, provoquait la synthèse de glycannes de type mixte dans le foie de rat.

L'allongement de ces glycannes se traduisant par la formation d'antennes se fera par l'addition successive :

1 - de fucose en α-1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache par une fucosyltransférase, à condition que la première N-acétylglucosamine soit transférée préalablement sur l'heptasaccharide à cinq mannoses (SCHACHTER et al. -109-) ;

2 - de galactose formant les chaînons de N-acétyllactosamine Gal(ß1-4)GlcNAc, par des galactosyltransférases spécifiques (voir la revue de SCHACHTER et ROSEMAN -110-) ;

3 - d'acide sialique sur le C3 ou le C6 du galactose en position terminale non réductrice, par des sialyltransférases (VAN DEN EIJNDEN et al. -111-) ;

4 - de fucose en α-1,3 ou en α-1,2 sur la N-acétylglucosamine ou le galactose, tous deux situés en position externe des glycannes (PAULSON et al. -112-, BEYER et al. -113-).

5 - de N-acétylglucosamine en ß-1,3 sur le galactose en position externe, par des N-acétylglucosaminyltransférases, dans le cas de la formation des glycannes de type poly-N-acétyllactosaminique (RUSSIN et al. -114-).

Différents exemples de ces structures sont donnés dans les tableaux IV et V (p. 19 et 20).

III - CONCLUSIONS

Un des problèmes majeurs de la biosynthèse des glycannes des N-glycosylprotéines réside dans le fait que l'on ne connaît pas les raisons pour lesquelles un glycanne restera de type oligomannosidique ou évoluera vers les types mixte et N-acétyllactosaminique.

POLLACK et ATKINSON (-115-) ont étudié la position des glycannes, sur la chaîne peptidique d'une cinquantaine de glycoprotéines dont la séquence peptidique, les sites de glycosylation et les structures glycanniques étaient connues. Les glycannes de type N-acétyllactosaminique sont localisés au voisinage de l'extrêmité N-terminale des protéines tandis que les glycannes de type oligomannosidique sont plus éloignés de cette région. Ce serait donc la nature de la partie peptidique au voisinage du site de glycosylation qui induirait la synthèse des glycannes de type N-acétyllactosaminique.

HSIEH et ROBBINS (-116-) ont examiné la synthèse et le "processing" des glycannes des glycoprotéines du virus Sindbis infectant des cellules de Moustique (cellules C6/36), ces dernières n'étant capables de synthétiser que des glycannes de type oligomannosidique. Après infection de cellules de Vertébrés, les glycoprotéines virales possèdent à la fois des structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. Lors de l'infection de cellules de Moustique par le virus Sindbis, la synthèse des glycannes de type oligomannosidique n'est pas modifiée tandis que les glycannes de type N-acétyllactosaminique ne pouvant être synthétisés dans ces cellules sont remplacés par la structure Man_3 $GlcNAc_2$, qui représente

la structure glycannique la plus "élaborée" synthétisée par ces cellules. Ces auteurs concluent que les déterminants peptidiques régulant la maturation et l'élongation des glycannes sont reconnus en dépit des divergences évolutives et de ce fait seraient universels.

Au vu de la complexité de la biosynthèse de glycannes, qui autorise une grande hétérogénéité structurale, on peut se poser la question suivante : cette hétérogénéité est-elle le reflet d'activités biologiques spécifiques ou est-elle sans signification ? C'est à cette question, que nous essaierons de répondre dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III
L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES : UN REFLET DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE.

Les glycoprotéines sont largement répandues dans le monde vivant, au niveau cellulaire, dans le cytoplasme ou intégrées dans les membranes et les parois cellulaires, ainsi que dans les sécrétions et les liquides biologiques. De nombreuses protéines longtemps considérées comme des holoprotéines se révèlent être des glycoprotéines et la contribution des sucres aux différentes activités biologiques de ces composés (enzymes, hormones, récepteurs, transporteurs membranaires, ...) demeure en grande partie inconnue.

Les premières approches de ce problème ont été possibles grâce à l'utilisation de glycosidases spécifiques, permettant d'enlever tout ou partie des sucres d'une glycoprotéine, en respectant l'intégralité de sa partie protéique, de manière à déterminer le rôle des sucres dans l'activité biologique (ROTH -117-), la difficulté majeure résidant dans l'obtention de glycosidases pures et dépourvues d'activité protéasique contaminante.

Un deuxième type d'approche, plus récent, est lié au fait que l'on dispose de substances permettant d'inhiber la glycosylation des protéines *in vivo* d'une manière contrôlée. Des antibiotiques comme la tunicamycine ou l'amphomycine, des analogues de substrats comme le 2-déoxy-D-glucose, inhibent, par exemple, le cycle des dolichols (voir les revues de STRUCK et LENNARZ -118-, SCHWARTZ et DATEMA -119-).

Une troisième approche consiste à sélectionner des mutants cellulaires résistants à diverses lectines cytotoxiques, qui présenteront des altérations permanentes des structures glycanniques des glycoprotéines cellulaires par déficit en certaines

glycosyltransférases. Des clones cellulaires, par comparaison aux lignées mères, sont d'excellents modèles d'étude du rôle des glycannes au niveau cellulaire (HUGHES et al. -120-).

L'utilisation de ces différentes méthodes a permis de dégager non pas un seul, mais de très nombreux rôles diversifiés et attribuables aux glycannes selon le type de glycoprotéine et la structure des glycannes. Mais les informations sur les relations structure glycannique - fonction biologique ne sont que très partielles, de même que très contradictoires selon les modèles étudiés.

I - ROLE DES GLYCANNES DANS LA CONFORMATION DES GLYCOPROTEINES.

La glycosylation des protéines introduit des modifications de leur masse moléculaire, de leur forme et de leurs propriétés physico-chimiques. Un premier exemple concerne les mucines des glandes sous-maxillaires de mouton, qui comportent plusieurs centaines de glycannes sialylés liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique (GOTTSCHALK -121-) conférant à la protéine une structure en bâtonnet à rapport axial élevé. La déglycosylation complète de cette mucine lui donne une structure globulaire et lui fait perdre la propriété de donner des solutions visqueuses (CALLAGHAN - ROSE et al. -122-).

Un autre bon exemple est apporté par les travaux du groupe de KORNFELD sur la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). En inhibant sa glycosylation par la tunicamycine, cette protéine s'agrège dans la cellule (GIBSON et al. -123-) et ne peut pas participer à l'assemblage du virus, mais cette agrégation est thermodépendante puisqu'en utilisant un mutant VSV (ORSAY), la protéine G non glycosylée ne s' agrège pas à 30°C (GIBSON et al. -124-). Ces phénomènes d'agrégation s'observent à la fin de la synthèse protéique, au moment où la protéine devrait acquérir sa structure tertiaire, si l'oligosaccharide Glc_3 Man_9 $GlcNAc_2$ n'est pas transféré (GIBSON et al.

-125-),d'où l'hypothèse qu'un des rôles majeurs de ce type d'oligosaccharide serait de permettre à la protéine d'acquérir sa conformation (KORNFELD -126-).

De nombreux glycoenzymes ont été soumis à l'action de glycosidases afin de comparer leurs activités avant et après déglycosylation. CHU et al. (-127-) montrent que la déglycosylation par l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H de l'invertase de levure de bière n'a pas d'effet direct sur son activité catalytique mais diminue sa résistance vis à vis des agents dénaturants (température, acides, ...). Des résulats similaires ont été obtenus sur d'autres types d'enzymes comme la ribonucléase (WANG et HIRS -128-).

La stabilisation des enzymes est un problème technologique très important et de récentes études montrent qu'il est possible d'augmenter, par exemple, la thermostabilité d'amylases par glycosylation non enzymatique (LENDERS et CRICHTON -129-).

II - EFFETS PROTECTEURS DES GLYCANNES ENVERS LA PROTEOLYSE NON SPECIFIQUE.

Au niveau cellulaire, de nombreuses protéines et glycoprotéines sont d'abord synthétisées sous la forme d'une chaîne polypeptidique de haut poids moléculaire qui donnera, après des digestions protéolytiques spécifiques, des composés biologiquement actifs (voir les revues de SCHWARTZ et DATEMA -130-, -131-). Ces phénomènes post-translationnels ont été étudiés dans la biosynthèse de trois glycoprotéines de l'enveloppe du virus Semliki Forest qui dérivent d'un précurseur unique glycosylé. En présence de tunicamycine, la protéolyse spécifique ne semble pas être modifiée (GAROFF et SCHWARZ -132-). Par contre, d'autres travaux comme ceux sur le précurseur de l'adrénocorticotropine et de la ß-lipotropine (LOH et GAINER -133-)

montrent qu'en l'absence de glycosylation, les protéases ne reconnaissent plus leurs sites spécifiques de coupure et de ce fait produisent des peptides atypiques dépourvus d'activité biologique.

III - LES GLYCANNES EN TANT QUE SIGNAUX DE RECONNAISSANCE.

Les glycoprotéines après leur synthèse au niveau du reticulum endoplasmique rugueux auront trois destinées (voir Figure 5 ; p.37) :

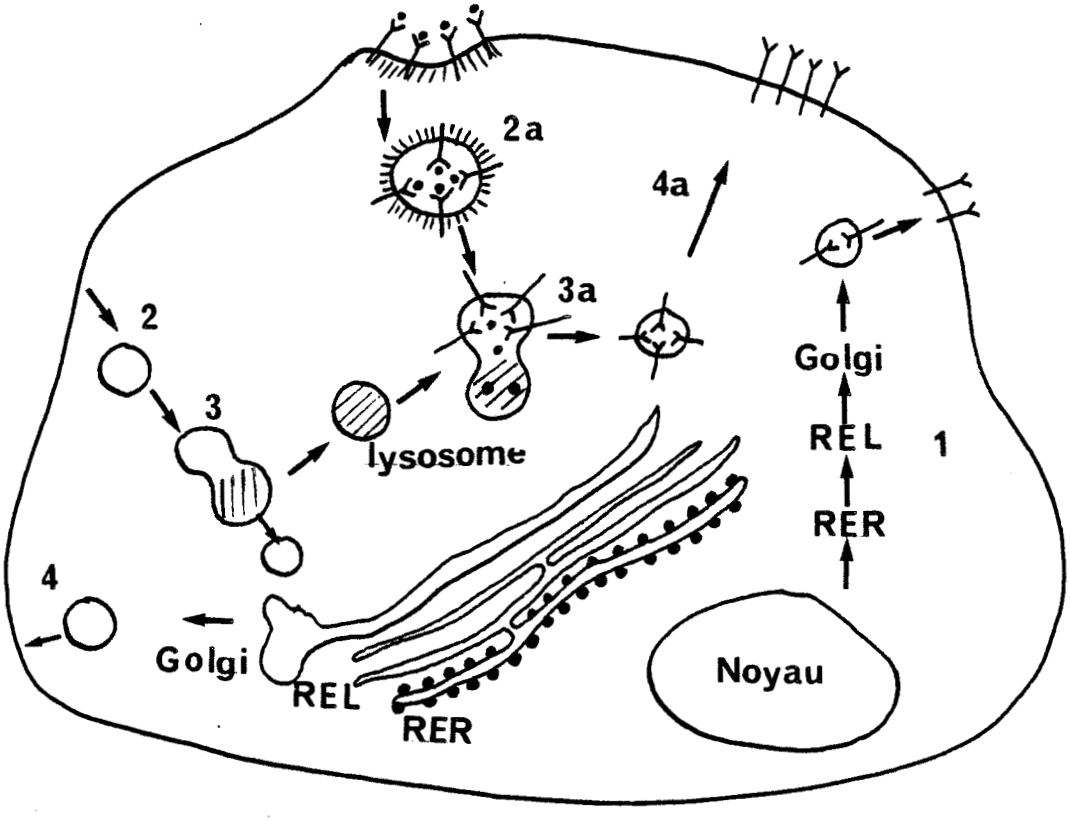
1 - intégration dans les membranes (cellulaires ou cytoplasmiques) dans le cas des glycoprotéines membranaires ;

2 - intégration dans les lysosomes pour les enzymes lysosomiales par phosphorylation en 6 de résidus de mannose de glycannes de type oligomannosidique ;

3 - déversement à l'extérieur de la cellule pour les glycoprotéines de sécrétion.

Selon leur destination, ces glycoprotéines solubles ou membranaires porteront des signaux de reconnaissance différents (protéiques et/ou glucidiques) et seront transportées spécifiquement vers les différents compartiments cellulaires.

L'hétérogénéité des structures glycanniques ne semble pas être liée aux destinées différentes des glycoprotéines membranaires ou solubles (excepté le cas particulier des enzymes lysosomiales décrit à la page p. 43). En effet, les glycannes des glycoprotéines solubles ou membranaires sont similaires et il est plus probable que la ségrégation entre ces deux types de composés soit dépendante de la séquence peptidique signal, (KORNFELD et KORNFELD -134-). Cette séquence permet l'ancrage dans la membrane du reticulum endoplasmique rugueux des protéines en voie de synthèse, puis la translocation complète dans la



BU LILLE

Figure 5 - Représentation schématique de la synthèse (1), du catabolisme (2, 3, 4) et du recyclage des récepteurs membranaires (2a, 3a, 4a). RER : reticulum endoplasmique rugueux ; REL : reticulum endoplasmique lisse; Y : glycoprotéine membranaire ; o : ligand ; ////// : clathrine (D'après : KREISEL et al. 135).

lumière du R.E.R., des glycoprotéines solubles, ou incomplète, des glycoprotéines membranaires qui restent ancrées dans la membrane (voir la revue de GOGSTAD et HELGELAND -136-).

Une autre hypothèse repose sur la présence de séquences peptidiques d'arrêt stoppant la translocation des glycoprotéines à destinée membranaire, et de séquences peptidiques d'élimination provoquant le passage complet des glycoprotéines a destinée excrétrice dans la lumière du R.E.R. (BLOBEL -137-).

Le mécanisme d'excrétion des glycoprotéines se ferait par l'intermédiaire de vésicules d'exocytose (voir la revue de MORRE et al. -138-), mais le mécanisme de distribution spécifique des glycoprotéines membranaires aux différents compartiments cellulaires (membranes nucléaires, mitochondriales, cytoplasmiques ...) reste énigmatique (GOGSTAD et HELGELAND -139-).

Il faut néanmoins remarquer que l'on ne dispose pas de données structurales suffisamment fines des glycannes des différents compartiments cellulaires pour négliger leurs rôles dans ces processus de transport.

Il existe de nombreux exemples du rôle des glycannes comme signaux de reconnaissance des glycoprotéines in situ ou pour leur catabolisme. Nous détaillerons ces deux points en séparant les glycoprotéines membranaires des glycoprotéines des liquides biologiques.

A - ROLE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES.

1 - En tant que déterminants antigéniques.

Tandis que les glycolipides de l'hématie supportent les activités de groupe sanguin A, B, O, les glycoprotéines de la membrane du globule rouge portent les déterminants M et N qui constituent le second système de groupe sanguin : c'est la glycophorine, glycoprotéine majeure de l'hématie qui porte ces activités de groupe sur ses glycannes de type O-glycosidique (structures décrites dans le Tableau II ; p.12) mais également grâce à la séquence pentapeptidique N terminale (SPRINGER et YANG -140-, WASNIOWSKA et al. -141-). L'activité de groupe I est également liée aux glycoprotéines membranaires de l'hématie et est portée par un glycanne de type N-glycosidique (EBERT et al. -142-).

De nombreux antigènes membranaires sont de nature glycoprotéinique, comme les antigènes d'histocompatibilité du système H-2 chez la Souris (NATHENSON et CULLEN -143-) mais dans ce cas il ne semble pas que les glycannes interviennent dans l'activité antigénique.

2 - En tant que récepteurs de virus et de bactéries.

L'infection de cellules d'Eucaryotes par des virus et des bactéries nécessite une étape de fixation de ces agents infectieux sur la membrane de la cellule hôte et les glycannes des glycoprotéines membranaires participent dans certains cas à ces phénomènes de reconnaissance. La glycophorine et plus particulièrement ses résidus d'acide N-acétylneuraminique jouent le rôle de récepteurs des myxovirus qui possèdent des lectines spécifiques de ces sucres (KATHAN et WINZLER -144-, PAULSON et al. -145-). Certaines souches d'Entérobactéries

pathogènes comme E.coli 346 possèdent des lectines spécifiques des glycannes de type oligomannosidique des glycoprotéines des membranes des cellules épithéliales (FIRON et al. -146-).

3 - En tant que récepteurs de molécules solubles.

Un très bel exemple de récepteurs hormonaux impliquant les glycannes nous est fourni par les recherches sur les récepteurs hépatocytaires et adipocytaires de l'insuline (CUATRECASAS et al. -147-). Ces auteurs ont montré que ces récepteurs sont des glycoprotéines perdant leur capacité de fixation de l'insuline après traitement par la ß-D-galactosidase. Ce sont, plus précisément, les glycannes du récepteur qui permettent d'abaisser sa constante d'affinité vis à vis de l'insuline (PICARD et al. -148-).

Un certain nombre de lectines isolées de plantes, comme la concanavaline A isolée de Canavalia ensiformis ou la PHA isolée de Phaesolus vulgaris, sont mitogènes à faible concentration, pour les lymphocytes (HADDEN et al. -149-, ALLAN et CRUMPTON -150-), et à forte concentration, deviennent cytotoxiques. D'autres lectines comme la ricine, lectine toxique RCA_2 de Ricinus Communis (NICOLSON et BLAUSTEIN -151-) ne présentent pas d'activité mitogène et sont cytotoxiques à faibles doses. Cette dernière propriété a été mise à profit par l'équipe de HUGHES (MEAGER et al. -152-) pour sélectionner des mutants cellulaires résistants à la ricine et par différents auteurs pour tirer partie de sa cytotoxicité en la ciblant spécifiquement vers les cellules cancéreuses à l'aide d'anticorps spécifiques. Dans ces deux cas, le ligand est une lectine et les récepteurs membranaires des glycannes de N-glycosylprotéines.

En ce qui concerne la stimulation mitogénique par la L_4PHA (une isolectine des P.H.A.), il ressort des travaux de CUMMINGS et KORNFELD (-153-) que le glycanne récepteur pourrait être du type N-acétyllactosaminique, tri- ou tétraantenné, possédant au moins un résidu d'α-mannose substitué sur ses carbones C-2 et C-6. Mais, la

relation entre la fixation de la lectine sur la membrane et le déclenchement de la mitose n'est pas connue. Dans le cas de la cytotoxicité de la ricine vis à vis des fibroblastes, le récepteur glycannique de cette lectine serait de type N-acétyllactosaminique puisque les mutants cellulaires résistants obtenus ne possèdent à leur surface que des glycannes de type oligomannosidique ou mixte (HUGHES et al. -154-).

Le cas particulier du récepteur d'ASHWELL sera traité à la page 44.

4 - Dans l'adhésion cellulaire.

Le rôle des glycannes dans les mécanismes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires reste mal connu. Différents modèles d'interaction intercellulaire mettant en jeu des couples glycanne-récepteur ont néanmoins été proposés :

1 - Selon ROSEMAN (-155-) et ROTH et al. (-156-), le récepteur serait une glycosyltransférase membranaire d'une cellule et, le substrat, un glycanne d'une autre cellule, et la formation du complexe enzyme-substrat serait responsable du phénomène de reconnaissance. Cependant, l'intervention des ectoglycosyltransférases dans l'adhésion cellulaire n'a pu être démontrée.

2 - Des lectines membranaires pourraient participer à la reconnaissance cellulaire, comme dans le cas de l'adhésion de cellules embryonnaires d'oursin (TONEGAWA et DOI-157-) ou dans les phénomènes de reconnaissance intercellulaire de l'amibe Dictyostelium discoideum (RAHMSDORF et al. -158-).

Des cellules de lymphome murin, à haut pouvoir métastasant, possèdent à leur surface des antigènes T, caractérisés par le disaccharide Gal(ß1-3)GalNAc situé à l'extrêmité non réductrice des glycannes membranaires. SPRINGER et al.(-159-) ont proposé que le récepteur lectinique d'ASHWELL spécifique des résidus de galactose (voir p.44) était responsable de la reconnaissance hépatocyte - cellules métastasantes.

D'autres molécules sont responsables de l'adhésion intercellulaire et, en particulier, la fibronectine, glycoprotéine de haut poids moléculaire. Mais les glycannes de la fibronectine ne semblent pas être impliqués dans cette fonction, puisqu'en présence de tunicamycine, la fibronectine non glycosylée conserve ses propriétés (OLDEN et al. -160-). Par contre, les glycannes des glycoprotéines membranaires auraient un rôle déterminant puisque des fibroblastes de rein de Hamster après croissance en présence de tunicamycine, présentent un défaut d'adhésion à la fibronectine (BUTTERS et al. -161-).

5 - Dans le recyclage et le catabolisme des glycoprotéines membranaires. (voir la revue générale de KREISEL et al. -162-)

Comparés aux études sur leur biosynthèse, très peu de travaux ont été réalisés sur le rôle, le mode de dégradation et le recyclage des glycoprotéines membranaires. Ces composés quittent la membrane plasmique à certaines périodes de la vie cellulaire :

1 - par un mécanisme d'internalisation conduisant à la formation de vésicules dont le contenu sera digéré sous l'action des enzymes lysosomiales ;

2 - par un mécanisme d'internalisation spécifique dans le cas de récepteurs accompagnés de leurs ligands, hormones, toxines, macromolécules ou particules (ANDERSON et al. -163-) sous la forme de "coated vesicles" dont l'enveloppe est constituée de clathrine (PEARSE -164-). Ces récepteurs seront ensuite recyclés vers la membrane plasmique après une dégradation ménagée de leurs glycannes et une reglycosylation golgienne (voir l'article de TANABE et al. -165-, pour le recyclage du récepteur d'ASHWELL).

Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure 5 (p.37).

B - ROLE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DES LIQUIDES BIOLOGIQUES.

1 - Rôle des glycannes dans le transport et l'excrétion des glycoprotéines solubles .

Il y a une vingtaine d'années, on ne disposait que de peu de renseignements sur le rôle biologique des glycannes et EYLAR (-166-) postula que la glycosylation constituait le "passeport" nécessaire à la sécrétion des glycoprotéines ("exit passport"). Disposant actuellement d'inhibiteurs de la glycosylation in vivo, on connaît de nombreux modèles infirmant cette hypothèse. Les sécrétions de l'ovalbumine de l'oviducte de poule (KELLER et SWANK -167-), de l'interféron humain (MIZRAHI et al. -168-), de la transferrine (STRUCK et al. -169-) ne sont pas inhibées en présence de tunicamycine. Par contre, les sécrétions de l'invertase de levure de bière (KUO et LAMPEN -170-) ou du procollagène de fibroblastes humains (HOUSLEY et al. -171-) sont modifiées en cas d'inhibition de la glycosylation.

C'est en ce qui concerne les hydrolases lysosomiales que le rôle des glycannes est le plus clair. Ces enzymes, synthétisées au niveau du reticulum endoplasmique rugueux, de la même manière que les glycoprotéines de sécrétion, vont être spécifiquement transférées dans les lysosomes où elles participeront aux différents catabolismes, dans un environnement acide. Trois types d'hypothèse de cheminement cellulaire de ces enzymes ont été proposés :

1 - transport intracellulaire (voir la revue de NOVIKOFF -172-) ;

2 - transport via une sécrétion et une recapture ultérieure (voir la revue de NEUFELD et al. -173-) ;

3 - transport via la surface cellulaire (HASILIK et NEUFELD -174-).

Les voies 2 et 3 ne sont pas à exclure, mais il semble que la voie 1 soit principale.

Le ciblage des enzymes lysosomiales vers les lysosomes met en jeu une série de modifications du glycanne résumées dans la Figure 6, (p.45), conduisant à la formation de mannose-6-phosphate à l'extrêmité non réductrice du glycanne (KAPLAN et al. -175-, HASILIK et al. -176-) qui sera reconnu par des récepteurs intracellulaires hautement spécifiques (SLY et FISCHER -177-). La présence de ces résidus de mannose-6-phosphate est essentielle au ciblage des enzymes lysosomiales néosynthétisées vers le lysosome : un déficit en N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase entraîne la non-formation de ce signal de reconnaissance et l'excrétion des enzymes (mucolipidoses II et III, HASILIK et al. -178-).

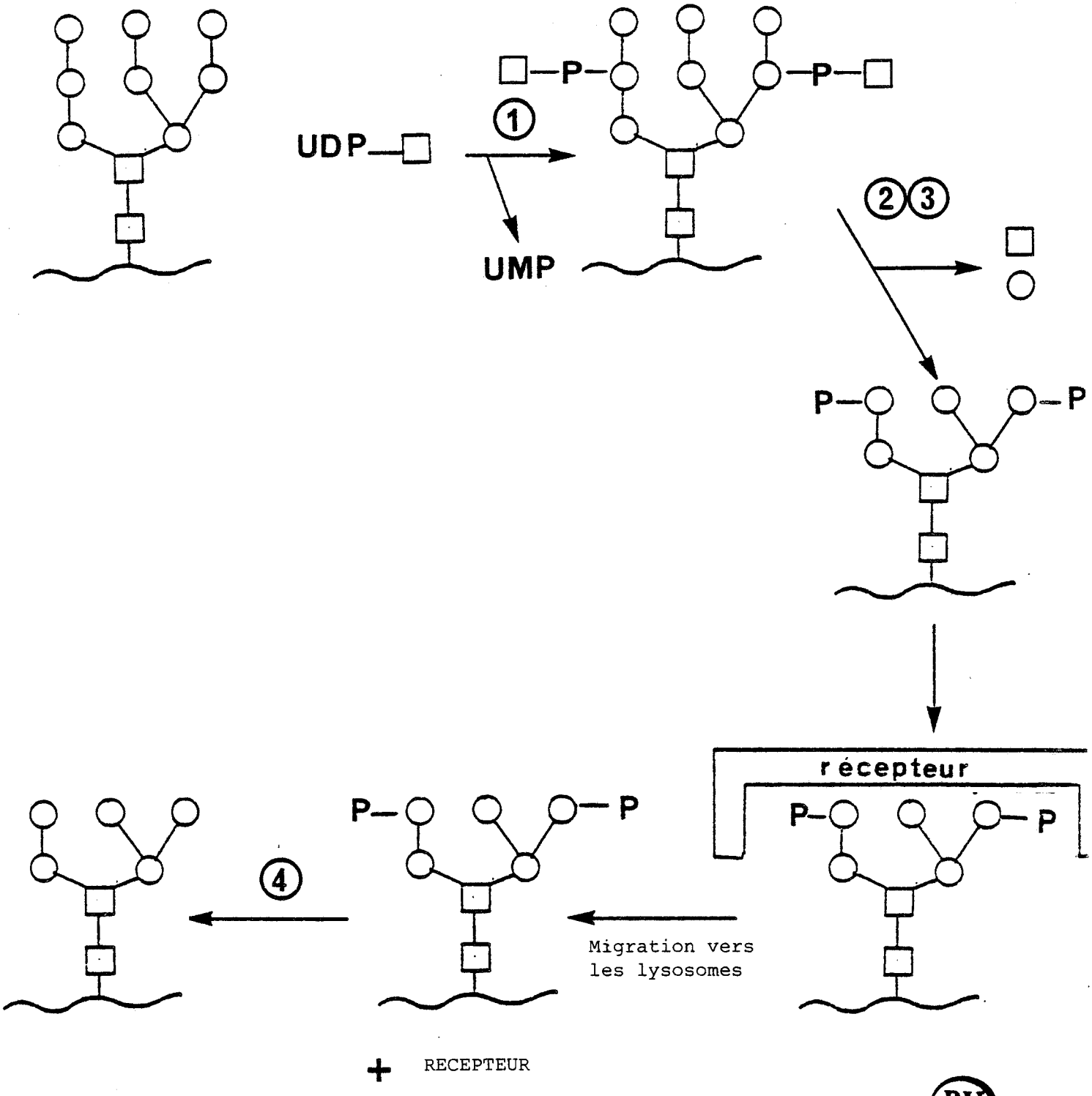


Figure 6 - Formation des mannose -6-phosphatesdes enzymes lysosomiales.
1 : N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase; 2: phosphoglycosidase; 3: α-mannosidase; 4: phosphatase; □ : N-acétylglucosamine; ○ : mannose.

BU LILLE

2 - Les glycannes des glycoprotéines circulantes sont des signaux de reconnaissance destinés à des cellules cibles.

La démonstration éclatante de ce rôle a été apportée par les travaux du groupe d'ASHWELL, dans les années 1970 (voir la revue d'ASHWELL et MORELL -179-) : la désialylation des glycoprotéines circulantes provoquant l'apparition de résidus de galactose en position terminale non réductrice des glycannes, entraîne leur rapide disparition du sang. Ces asialoglycoprotéines sont d'abord reconnues par des récepteurs spécifiques du galactose présents à la surface des hépatocytes, puis internalisées par l'intermédiaire d'endosomes et dégradées après la constitution d'un lysosome secondaire par fusion des endosomes et des lysosomes primaires. Ces récepteurs sont de nature glycoprotéinique (KAWASAKI et ASHWELL -180-) et la présence d'acide sialique est nécessaire à la reconnaissance (STOCKERT et al. -181-).

Des recherches de ce type de récepteurs ont été menées sur d'autres types cellulaires, comme les cellules de Kupfer qui possèdent des récepteurs à galactose responsables du catabolisme de particules comme des erythrocytes âgés ou des cellules tumorales circulantes (KOLB-BACHOFEN et al. -182-). De tels récepteurs se retrouvent chez les Poissons, les Oiseaux, les plantes (voir la revue de MONSIGNY et al. -183-).

IV - CONCLUSIONS.

A travers ces différentes études, il apparaît que les glycannes jouent deux types de rôle :

Le premier est d'ordre physicochimique : les glycannes stabilisent la protéine, contribuent à la formation de sa structure tertiaire et la protège de l'action de protéases non spécifiques.

Le second est beaucoup plus précis puisqu'il est fondé sur le concept de signal de reconnaissance porté par les glycannes. Il n'existe pas de fonction précise pour les glycannes en ce domaine mais toute une série d'activités biologiques dépendantes de la structure glycannique mais également de la nature de la protéine.

Néanmoins, deux questions majeures restent actuellement sans réponse :

1 - La microhétérogénéité structurale des glycannes, se traduisant par des différences allant jusqu'à des variations minimes affectant les monosaccharides situés à l'extrêmité terminale non réductrice des glycannes, a t-elle une signification biologique ? Le seul exemple précis concerne les signaux de nature glucidique porté par les enzymes lysosomiales ;

2 - qu'elle est la signification de l'hétérogénéité des glycannes portés par une glycoprotéine ?

De plus, dans de nombreux cas, la modification des glycannes semble être liée à l'affection pathologique. C'est ce que nous allons examiner dans le chapitre suivant consacré aux modifications glycanniques accompagnant la transformation maligne des cellules.

CHAPITRE IV
MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNE.

I - DONNEES GENERALES SUR LES MODIFICATIONS AFFECTANT LES GLYCOCONJUGUES DE SURFACE LORS DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE.

(voir les revues de ATKINSON et HAKIMI -184-, DEBRAY -185-, NICOLSON -186-, HAKOMORI -187- et HYNES -188-).

Les surfaces cellulaires sont étroitement liées aux fonctions de reconnaissance et d'adhésion et interviennent dans la régulation des proliférations cellulaires. Les cellules transformées chimiquement, viralement ou spontanément présentent des modifications à leur surface dont les effets sont les suivants :

- diminution de l'adhésivité cellulaire (COMAN -189-), qu'elle soit intercellulaire ou vis-à-vis du substratum ;

- perte de l'inhibition de contact (TODARO et GREEN -190-, LEVINE et al. -191-) ;

- perturbation de la perméabilité membranaire et des transports actifs (PARDEE -192-).

Dans la mesure où les glycoconjugués membranaires sont directement impliqués dans le comportement cellulaire (LLOYD -193-), tout changement de ces molécules associé à la transformation maligne peut être relié au comportement anarchique des cellules transformées. Cette modification des glycoconjugués de surface entraîne :

- une augmentation de l'agglutinabilité pour certaines lectines comme la lectine de blé (AUB et al. -194-) ou la concanavaline A ;

- une simplification de la structure des glycolipides membranaires (HAKOMORI et MURAKAMI -195-) ;

- une "fuite" de la fibronectine de la surface cellulaire (HYNES -196-) ;

- une augmentation de la taille des glycopeptides fucosylés et sialylés, isolés de la surface cellulaire (MEEZAN et al. -197-, BUCK et al. -198-, SMETS et al. -199-, DEBRAY et al. -200-, WARREN et al. -201-).

Nous limiterons notre étude au dernier point évoqué ci-dessus.

II - MODIFICATIONS DES STRUCTURES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DE SURFACE LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNE DES CELLULES.

A - L'AUGMENTATION DE LA TAILLE DES GLYCANNES : UN MARQUEUR DE LA TUMORIGENICITE, MAIS NON SPECIFIQUE.

Les premières études comparatives des structures de glycopeptides isolés de glycoprotéines de cellules normales et transformées (essentiellement des fibroblastes transformés ou non viralement) sont dues à l'équipe de WARREN (BUCK et al. -202-, -203-, -204-). Comme dans la plupart des travaux ultérieurs, la méthodologie etait la suivante :

1 - marquage métabolique des cellules pendant la phase exponentielle de croissance à l'aide de monosaccharides marqués au tritium ou au carbone 14, essentiellement le fucose, la glucosamine et le mannose ;

2 - décapage de la surface cellulaire par la trypsine et récupération des glycopeptides marqués qui sont ensuite digérés par la pronase pour aboutir à des glycopeptides ne possédant plus que 1 à 4 acides aminés, de manière à minimiser l'influence de la chaîne peptidique au cours des analyses ultérieures ;

ou 2bis - digestion par la pronase de membranes plasmiques isolées ou de membranes cellulaires totales et récupération des glycopeptides marqués ;

3 - Analyse par co-chromatographie, essentiellement de tamisage moléculaire, des glycopeptides provenant des cellules normales et transformées, marqués les uns par le tritium, les autres par le carbone 14.

Les glycopeptides ainsi obtenus contiennent de la N-acétylglucosamine, du mannose, du galactose, du fucose, des acides sialiques et de la N-acétylgalactosamine et sont, pour la majeure partie, de type N-glycosidique (GLICK -205-, WARREN et al. -206-). La Figure 7 (p.51) montre le profil classique de séparation obtenu par chromatographie d'exclusion sur Sephadex G50, découpé arbitrairement en quatre familles glycopeptidiques allant de la plus lourde à la plus légère (WARREN et al. -207-) :

1 - un pic exclu correspondant aux protéoglycannes et aux glycopeptides de type O-glycosidique non digérés par la pronase ;

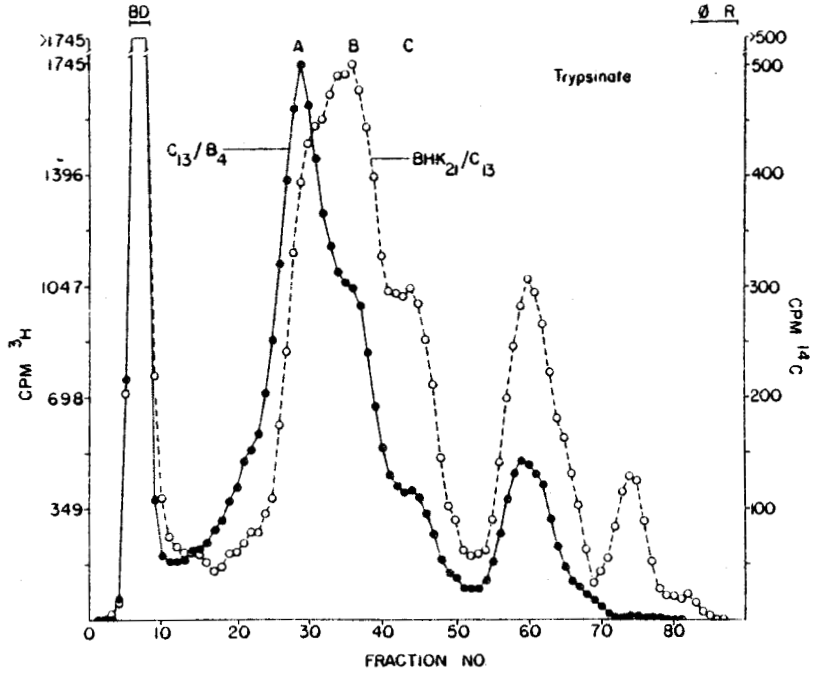


Figure 7 - Profil d'élution (Sephadex G 50) de glycopeptides de surface de cellules normales (BHK_{21}/C_{13}) et transformées (C_{13}/B_4). Ces glycopeptides ont étéé isolés des cellules par trypsination et ensuite soumis à l'action de la pronase. (WARREN et al. -208-)

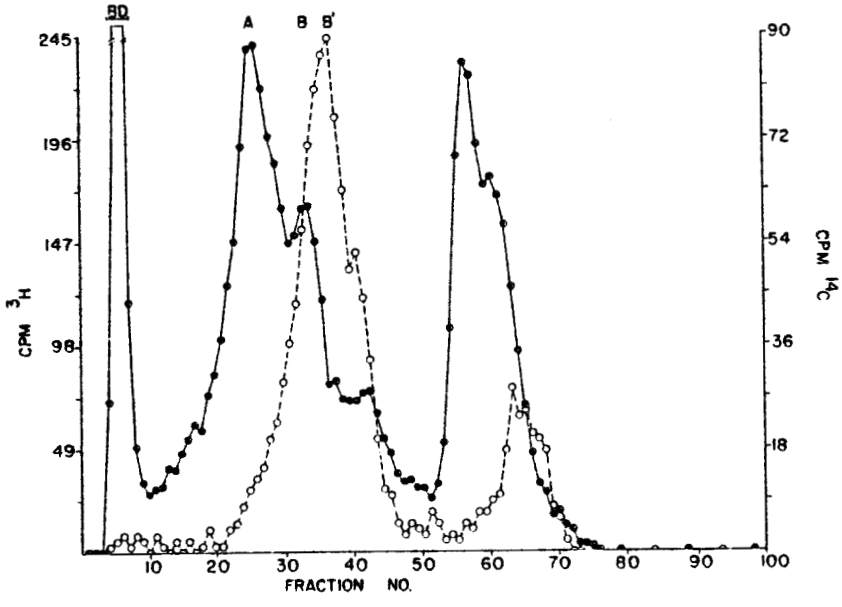


Figure 8 - Profil d'élution (Sephadex G 50) de glycopeptides de surface de cellules transformées (C_{13}/B_4) avant (●—●, ^3H) et après (o—o, ^{14}C) l'action de la neuraminidase. (WARREN et al. -209-).

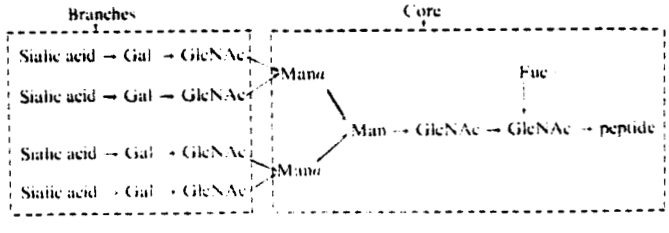


Figure 9 - Structure des glycopeptides majeurs isolés de cellules transformées. (OGATA et al. -210-)

BU LILLE

2 - une fraction A correspondant aux glycopeptides sialylés et fucosylés les plus lourds (M.M. apparente : 4 600) ;

3 - une fraction B correspondant à des glycopeptides sialylés et fucosylés plus légers que les précédents (M.M. apparente : 3 500) ;

4 - une fraction C contenant surtout du mannose et de la N-acétylglucosamine et correspondant aux glycopeptides de type oligomannosidique (M.M. apparente : 1 500).

Dans ce type d'expérimentation, le fait majeur réside dans l'augmentation des glycopeptides de la fraction A ("fast eluting glycopeptides") dans le cas des cellules transformées. Cette observation initialement réalisée à partir de fibroblastes de Hamster transformés par différents types de virus (BUCK et al. -211-) a ensuite été étendue à d'autres types cellulaires comme les cellules d'hépatome de rat (VAN BEEK et al. -212-) ou les cellules leucémiques humaines (VAN BEEK et al. -213-). Avant de détailler les différentes modifications phénotypiques des glycannes accompagnant la transformation maligne, il convient d'abord de faire quelques remarques sur les systèmes de comparaison.

Le premier problème réside dans le choix de la cellule normale de référence. En effet, ces cellules sont pour la plupart des lignées cellulaires continues et certaines peuvent se révéler franchement tumorigènes après injection à l'animal (DEFENDI et al. -214-, BOONE et JACOBS -215-). Il est préférable de choisir comme cellule de contrôle des cellules en culture primaire (ATKINSON et HAKIMI -216-). Le

deuxième problème est lié à l'interprêtation des résultats : les différences observées sont-elles des marqueurs de la malignité ou de la croissance élevée des cellules transformées ?

Par ailleurs, SPIK et al. (-217-) ont étudié les modifications affectant les glycannes de la sérotransferrine humaine lors de cas pathologiques. Ces auteurs ont observé une nette augmentation des glycannes triantennés lors d'hépatite virale ou de cirrhose et ont également retrouvé ce phénomène lors de la grossesse (SPIK, communication personnelle) : l'augmentation de la taille des glycannes n'est donc pas spécifique de la tumorigénicité.

B - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOPEPTIDES DE LA FRACTION A ET B DES CELLULES NORMALES ET TRANSFORMEES.

WARREN et ses collaborateurs (BUCK et al. -218-, BUCK et al. -219- , WARREN et al. -220-) ont montré que l'un des facteurs dominants dans l'augmentation de la taille des glycopeptides de la fraction A par rapport à ceux de la classe B résidait dans leur plus haute sialylation, puisque après désialylation et analyse co-chromatographique par tamisage moléculaire des glycopeptides des deux types cellulaires, leurs profils d'élution étaient identiques (voir Figure 8 ; p. 51).

Mais la méthodologie utilisée restait limitée et ce sont OGATA et al. (-221-) qui montrèrent, par l'utilisation de glycosidases spécifiques et de la chromatographie d'affinité sur concanavaline A

insolubilisée sur Sepharose, que l'alourdissement du pic A résultait non seulement d'une hypersialylation, mais aussi de l'addition de résidus de N-acétyllactosamine sur le noyau pentasaccharidique conduisant à la formation de glycannes tétraantennés (voir Chapitre I et Figure 9 ; p.51). BLITHE et al. (-222-) montrèrent que les fibroblastes transformés par le virus de Rous contenaient plus de glycopeptides non reconnus par la concanavaline A que les cellules normales de référence, conduisant à un alourdissement des structures. Ces auteurs dénombrèrent dans les deux types de cellules plus de 40 glycopeptides différents et précisèrent que les différences étaient d'ordre quantitatif et non qualitatif. TAKASAKI et al. (-223-) confirmèrent que plutôt que la sialylation, la clef de l'augmentation de la taille des glycopeptides des cellules transformées résidait dans la muntiantennarisation des structures glycanniques mais les différences étaient qualitatives avec l'apparition de structures penta- et hexa-antennées. La transformation maligne serait donc accompagnée de l'apparition de glycosyltransférases n'existant pas ou ayant une activité faible dans les cellules normales. Ces résultats ont ensuite été rétractés par la même équipe (YAMASHITA et al. -224-) qui retrouvaient le même type de structures glycanniques dans les deux types cellulaires mais avec une augmentation nette des structures tétraantennées et poly-N-acétyllactosaminiques pour les cellules transformées (fibroblastes de rein de Hamster transformés par le virus du polyome) (voir Figure 10 ; p.55). Il est à noter que ces résulats ont été obtenus par marquage externe, par réduction au borohydrure de sodium tritié, des glycannes membranaires isolés après hydrazinolyse/N-réacetylation (voir Matériel et Méthodes, p. 60) et que ces auteurs ne trouvaient pas de différences notables avec les résultats antérieurs de TAKASAKI et al. (-225-), obtenus par marquage métabolique des cellules, hormis la réserve signalée précédemment.

Ces altérations de la taille des glycopeptides accompagnant la transformation cellulaire sont généralisables quelle que soit l'origine des membranes (cytoplasmiques, microsomiales, mitochondriales ou nucléaires) (BUCK et al. -226-, MURAMATSU et al. -227-) et

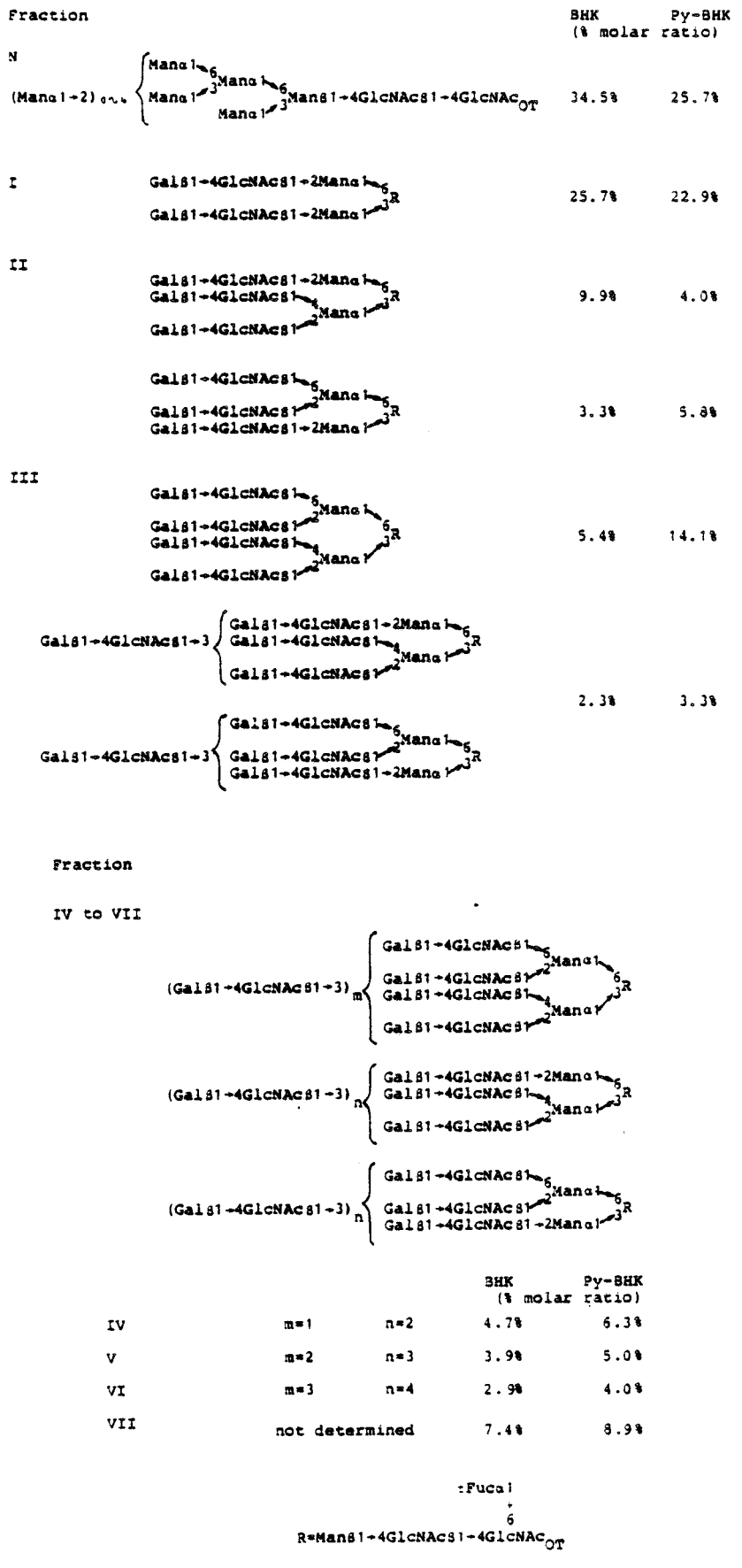


Figure 10 - Stuctures des oligosaccharides membranaires de cellules normales (BHK) et transformées (Py-BHK).Les % sont calculés sur la base des radioactivités incorporées dans chaque fraction.(YAMASHITA et al. -231-).

BU LILLE

correspondent à un critère de tumorigénisation plutôt que de transformation comme l'ont montré SMETS et al. (-228-), ces altérations étant retrouvées dans des cellules capables d'induire la formation rapide de tumeurs malignes chez l'animal in vivo.
Par ailleurs, ces modifications de la taille des glycannes se retrouvent à partir de tumeurs marquées in vivo (EMELOT et al. -229-) et sont spécifiques de la transformation maligne des cellules plutôt que de la croissance cellulaire (WARREN et al. -230-). Enfin, VANBEEK et al. (-231-), ont montré que l'augmentation de taille des glycopeptides de la classe A n'est pas un épiphénomène du processus de cancérisation puisque leur apparition est concomitante à celle des anomalies chromosomales.

C - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOPEPTIDES DE LA FRACTION C DES CELLULES NORMALES ET TRANSFORMEES.

La Figure 7 (p.51) nous montre, par chromatographie de tamisage moléculaire, qu'en plus des pics A et B, une troisième fraction C de glycopeptides plus légers est obtenue par marquage métabolique à partir de N-acétylglucosamine ou de mannose radioactifs précurseurs, puisque cette fraction ne contient essentiellement que ces deux monosaccharides et non pas de fucose (ATKINSON et HAKIMI -233-). Bien que très peu d'études aient été consacrées aux glycannes de type oligomannosidique, il en ressort néanmoins que les membranes des cellules en croissance ou transformées sont plus riches en ce type de glycannes que leurs homologues en phase stationnaire (CECCARINI et al. -234-, MURAMATSU et al. -235-). Afin de préciser si les modifications affectant cette famille de glycopeptides étaient liées à la transformation maligne où à la croissance cellulaire, CECCARINI et ATKINSON (-236-) ont comparé la composition des glycopeptides de surface de 3 types cellulaires, après incorporation de mannose ^{3}H ou ^{14}C par des fibroblastes humains pendant la phase exponentielle de croissance ou

pendant la phase stationnaire où les cellules deviennent confluentes, et aux mêmes fibroblastes transformés par le virus simien 40 (SV40). Bien que la méthodologie utilisée par ces auteurs ne soit pas complète, ils en déduisent que l'augmentation de structures oligomannosidiques à la surface cellulaire est reliée à la croissance (48 % du marquage pour ce type de glycanne contre 30 % pour les cellules quiescentes) et à la transformation cellulaire (67 % du marquage).

Ces relations entre la croissance et la modification des oligosaccharides de type oligomannosidique ont été également étudiées par HAKIMI et ATKINSON (-237-) qui utilisèrent une sonde, le virus Sindbis, de manière à étudier la biosynthèse glycoprotéinique de fibroblastes embryonnaires de poulet en croissance et en phase stationnaire de croissance. Plutôt qu'une augmentation du taux de glycannes oligomannosidiques dans les cellules se multipliant, ces auteurs notent un glissement vers les structures oligomannosidiques les plus lourdes. Enfin, RUPAR et COOK (-238-) montrèrent qu'il n'y avait pas d'incorporation de mannose radioactif dans des thymocytes de Souris comparés aux thymocytes stimulés par la concanavaline A ou à des lymphoblastes leucémiques, et en déduisirent que la synthèse de ce type d'oligosaccharide était associée à la multiplication cellulaire plutôt qu'à la tumorigénicité. De plus, ces auteurs précisèrent, par des expériences de chasse radioactive, que ces glycannes oligomannosidiques n'étaient pas des intermédiaires, mais des produits finals de la biosynthèse des glycannes des N-glycosylprotéines..

Enfin, il faut noter que les recherches sur cette classe de composés ne sont que très partielles, comparées aux travaux sur la classe A, dans la mesure où cette dernière classe est le support majeur des modifications glycanniques accompagnant la tumorigénisation.

Les différents travaux que nous venons d'examiner sont essentiellement des études comparatives de glycannes totaux de cellules normales et transformées et il s'agit de ce fait de comparaisons

globales. Différentes équipes se sont attaché à purifier une glycoprotéine donnée à partir des deux types cellulaires et à analyser leur partie glycannique dont :

- la fibronectine ou LETS (Large External Transformation Sensitive protein) dont le taux diminue nettement à la surface des fibroblastes transformés viralement (HYNES -239-) et pour laquelle on note une multianténnarisation et une hypersialylation des structures glycanniques accompagnant la transformation maligne (DELANNOY et al. -240-, MURAMAYA et al. -241);

- la γ-glutamyltranspeptidase, glycoprotéine associée au transport membranaire des acides aminés, présente à la surface de cellules épithéliales de différents organes comme le foie, et dont l'activité augmente considérablement en cas d'hépatome (FIALA et al. -242-) et pour laquelle KOBATA et al. (-243-) montrèrent une augmentation du nombre de glycannes par molécule et la présence de structures biantennées possédant une N-acétylglucosamine intercalaire (40 % des glycannes) dans le cas d'hépatome, ce type de structure n'existant pas dans le foie normal.

III - CONCLUSIONS.

En conclusion, les modifications majeures affectant les glycannes des glycoprotéines membranaires lors de la transformation maligne des cellules sont :

1 - pour les glycannes de type N-acétyllactosaminique, une hypersialylation et une augmentation du nombre d'antennes responsables de l'alourdissement des structures des glycopeptides des cellules transformées mais, ces différences resteraient plutôt d'ordre quantitatif ;

2 - pour les glycannes de type oligomannosidique, une augmentation du taux et de la taille de ces structures associée non seulement à la tumorigénicité, mais également à la croissance cellulaire.

Toutes ces modifications sont vraisemblablement liées à un déréglement de la biosynthèse des glycoprotéines, associé à la transformation. L'augmentation des structures complexes, dans le cas des cellules transformées, pourrait, par des phénomènes d'encombrement stérique, être une des causes de la perte d'adhésivité cellulaire, phénomène conduisant à l'apparition de métastases in vivo. Néanmoins, aucune preuve directe ne peut, à l'heure actuelle, étayer cette hypothèse.

CHAPITRE V : CONCLUSIONS

Les généralités que nous venons de présenter sur la Biologie Moléculaire des glycoconjugués montrent que des lois précises régissent la structure de leurs glycannes. En effet, bien que l'on dénombre actuellement plusieurs centaines de structures différentes de glycannes, toutes dérivent d'un motif pentasaccharidique invariant, et l'explication de ce phénomène a été fournie par la découverte d'une voie biosynthétique commune. Néanmoins, la signification biologique de cette hétérogénéité structurale n'est que très partiellement élucidée.

Jusqu'à présent, nous avons essentiellement raisonné en terme de structures glycanniques primaires, mais il ne faudrait pas négliger les travaux sur la conformation des glycannes sur laquelle reposent les raisonnements de la Biologie Moléculaire des glycocongugués. MONTREUIL (-244-), en 1975, s'est attaché à définir la conformation des glycannes biantennés, et a proposé le modèle en Y qui a ensuite évolué, en fonction des résultats obtenus par différentes méthodes physiques (R.M.N., R.P.E., diffraction des rayons X ...), vers trois autres modèles de conformation interconvertibles : T-, "bird-" et "broken wing"-conformation, où le trisaccharide terminal Man (ß1-4)GlcNAc (ß1-4)GlcNAc est disposé dans un plan, et les antennes plus ou moins repliées sur la protéine (MONTREUIL -245-). Ces antennes, qui portent les activités biologiques, sont flexibles et adoptent, selon l'environnement, différentes conformations et c'est dans ce sens qu'il faut considérer le concept glycanne - signal de reconnaissance.

L'étude du rôle biologique des glycannes nécessite en premier lieu la détermination de leurs structures primaires, rendue possible grâce au développement de méthodologies adaptées. Nos travaux s'inscrivent dans ce domaine et nous nous étions proposé, d'étudier une méthode de libération des glycannes des N-glycosylprotéines, l'hydrazinolyse, en l'appliquant à des glycoprotéines d'origines diverses, de mettre au point différentes méthodes de fractionnement des glycannes ainsi libérés dans le but de miniaturiser ces méthodes.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - CHOIX DE LA METHODE DE LIBERATION DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES : L'HYDRAZINOLYSE.

Jusqu'en 1979, la préparation des glycannes liés N-glycosidiquement à la protéine faisait essentiellement appel à l'utilisation d'enzymes protéolytiques. Cette méthode présente le désavantage de fournir des glycopeptides possédant une partie protéique de longueur variable qui rend difficile les séparations ultérieures. Actuellement, il est possible de libérer les glycannes de la protéine par hydrolyse enzymatique, soit en utilisant des endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidases qui coupent la liaison GlcNAc(ß1-4)GlcNAc du noyau pentasaccharidique commun aux glycannes de type N-glycosidique et libèrent des oligosaccharides ne possédant qu'une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, soit en utilisant des aspartylglycosylamine amidohydrolases qui coupent la liaison GlcNAc (ß1-N) Asn et libèrent le glycanne entier. Mais ces enzymes possèdent des spécificités plus ou moins étroites interdisant la libération quantitative de n'importe quel glycanne.

BAYARD et MONTREUIL (-246-), en 1974, ont étudié une méthode de libération des glycannes des glycoprotéines, l'hydrazinolyse, qui présente l'intérêt de N-désacétyler les N-acétylglucosamines. Couplée à la désamination nitreuse, cette technique leur a permis de montrer l'existence d'un motif pentasaccharidique commun à tous les glycannes de type N-glycosidique.

Nos recherches ont d'abord conduit à utiliser l'hydrazinolyse avec une finalité différente : recherche des conditions expérimentales permettant une libération quantitative des glycannes par l'hydrazine anhydre et une N-réacétylation totale des glycannes conduisant à la restauration de la structure initiale du glycanne.

A - PRINCIPE.

L'hydrazine anhydre coupe spécifiquement les liaisons amides (liaison peptidique et fonction acétamido par exemple) et esters en libérant, sous la forme d'hydrazides, les acides dont le carboxyle est conjugué. Ce principe a tout d'abord été appliqué à l'identification des amino-acides C-terminaux des protéines (AKABORI et al. -247-) et son emploi a ensuite été étendu aux protéoglycannes et aux glycoprotéines (YOSIZAWA et al.-248-, BAYARD et MONTREUIL -249-). Dans ce cas, l'hydrazine désacétyle les N-acétylglucosamines et libère les glycannes liés à la protéine par une liaison asparaginyl -N-acétylglucosamine. ISEMURA et SCHMID (-250-) ont couplé l'hydrazinolyse à la désamination nitreuse des glycannes N-désacétylés obtenus, afin de réaliser des coupures sélectives des liaisons glucosamine-monosaccharide.

B - MODE OPERATOIRE.

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans un minimum d'hydrazine anhydre et portés à 105°C pendant 20 h. L'hydrazine est ensuite évaporée sous courant d'azote, suivi de plusieurs rinçages par le toluène et le résidu sec est mis dans un dessicateur sous H_2SO_4 pendant une nuit afin d'éliminer les traces résiduelles d'hydrazine. Les glycannes libérés sont ensuite repris par de l'acide acétique à 5 %, à 4°C et débarrassés des contaminants micromoléculaires (hydrazides d'acides aminés, sels) par passage sur une colonne de Biogel P2 (200-400 mesh) équilibrée dans l'eau.

Les oligosaccharides sont repérés en sortie de colonne par le réactif au phénol-sulfurique (DUBOIS et al. -251-).

Les glycannes déacétylés sont repris, après concentration à l'évaporateur rotatif, par du bicarbonate de sodium saturé auquel on ajoute de l'anhydride acétique à intervalles réguliers selon la technique de N-réacetylation de READING et al. (-252-). Les échantillons sont ensuite dessalés sur une colonne de Biogel P2, comme

indiqué ci-dessus. Quand nous ne disposions que de faibles quantités de matériel glucidique, les glycannes ont été N-réacetylés, en partie, avec de l'anhydride acétique ^{14}C afin de pouvoir facilement repérer de faibles quantités d'oligosaccharides lors des différents fractionnements.

Dans certains cas, les oligosaccharides ont été réduits : après 2 h de réaction en présence d'un excés de borohydrure de sodium, l'échantillon est neutralisé par de la résine Dowex 50x8 (25-50 mesh ; sous forme H^+), l'acide borique est éliminé sous forme de méthyl borate par évaporation sous vide en présence de méthanol et par dessalage sur une colonne de Biogel P2.

Ce procédé de coupure s'est révélé quantitatif et conservatif puisqu'il n'induisait pas de modifications majeures de structures des glycannes, hormis les modifications de la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine étudiées par MICHALSKI et al. (-253-). D'autre part, nous avons pu vérifier que cette méthode était applicable aux glycopeptides, à des glycoprotéines isolées ou intégrées dans les membranes cellulaires (HOFLACK et al. -254-).

II - FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES ISSUS DE L'HYDRAZINOLYSE/N-REACETYLATION.

A - SEPARATION EN FONCTION DE LEURS CHARGES.

Les glycannes de type N-acétyllactosaminique ont été fractionnés en fonction du nombre de résidus d'acides sialiques, électrophorétiquement ou chromatographiquement.

1 - Electrophorèse à haut voltage sur papier.

Les fractions de type N-acétyllactosaminique sont séparées en sous-fractions neutre , monosialylée et disialylée par électrophorèse préparative à haut voltage (75V/cm) sur papier Whatman 3, en tampon acétate de pyridine pH 5,4, 3 h à 4°C selon la méthode de GRIMMONPREZ et MONTREUIL (-255-). Le voltage est maintenu constant à 4 KV et l'intensité est réglée entre 60 mA et 100 mA de façon à ne pas dépasser une puissance de 400 W. Après une migration de 3 h à 4°C les témoins de migration neutre, monosialylé et disialylé, libérés de la sérotransferrine humaine (SPIK et al. -256-) par hydrazinolyse, sont révélés par la méthode au nitrate d'argent selon TREVELYAN et al. (-257-). Le reste de la feuille est découpé en bandes de 1 cm et les produits étudiés sont repérés après élution des bandes dans 0,5 ml d'eau et comptage de la radioactivité en scintillation liquide.

2 - Chromatographie d'échange d'anions.

a - en basse pression.

Les glycannes ont été séparés par chromatographie d'échange d'anions sur une colonne (20 x 1 cm) d'AG1-X2 (minus 400 mesh, forme acétate) équilibrée dans l'eau. L'élution est réalisée par un gradient continu d'acétate de pyridine pH 5 de 0 à 400 mM., le débit étant de 10 ml/h.

b - en haute pression.

Les glycannes libérés par hydrazinolyse et N-réacétylés ont été fractionnés en fonction du nombre de résidus d'acides sialiques, par H.P.L.C. d'échange d'ions sur une colonne Micropak AX-10 (Varian Associates) selon la méthode de BAENZIGER et NATOWICZ (-258-).

Les conditions expérimentales sont les suivantes : phase mobile : H_2O ; l'élution est réalisée par un gradient discontinu de KH_2PO_4 pH 4,0 ; débit 1 ml/min ; les fractionssont de 0,64 ml comptées directement en scintillation liquide. Après lyophilisation, les échantillons préalablement filtrés sont repris par H_2O (50 µl) et

injectés, la colonne étant équilibrée dans l'eau. Après 10 min de rinçage, la concentration en KH_2PO_4 est amenée linéairement de 0 à 25 mM en 10 min. Cette concentration est maintenue à 25 mM pendant 5 min, puis amenée, toujours linéairement, à 100 mM en 30 min. La fraction neutre n'est pas retenue sur la colonne éluée directement par H_2O, les glycannes acides étant élués par des concentrations croissantes de KH_2PO_4.

Pour étalonner la colonne, nous avons utilisé les glycannes de l'orosomucoïde libérés par hydrazinolyse et N-réacétylés par l'anhydride acétique ^{14}C.

B - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE CON A - SEPHAROSE 4B.

Les oligosaccharides ont été fractionnés en fonction de leur affinité vis à vis de la Con A-Sepharose 4 B (colonne de 20 x 1,5 cm) équilibrée dans un tampon acétate de sodium 5mM, pH 5,2 ; NaCl 0, IM ; $CaCl_2$ 1mM ; $MnCl_2$ 1mM ; $MgCl_2$ 1mM. Le débit d'élution est de 9 ml/h et les fractions sont de 1,6 ml. Les échantillons sont repris par ce tampon, injectés et la colonne est rincée par 100 ml de tampon (3 fois son volume), puis éluée par l'α-Me.Glc, d'abord par 100 ml d'α-Me.Glc10mM, puis par 100 ml d'α-Me.Glc 0.3 M, en solution dans le même tampon. Les différents pics d'élution obtenus sont dessalés sur une colonne de Biogel P2 équilibré dans l'eau.

La spécificité de cette lectine (DEBRAY et MONTREUIL -259-) permet d'obtenir quatre fractions distinctes. Une première fraction non retenue sur la colonne (FNRC) est éluée par le tampon au volume mort de la colonne et correspond à des glycannes tri-, tétraantennés et biantennés possèdant une N-acétylglucosamine intercalaire. Une deuxième fraction légèrement retardée (FRC) possédant une faible affinité vis-à-vis de la Con A, mais toujours éluée par le tampon, peut être obtenue. L'élution de la colonne par de l'α-Me.Glc 10 mM permet d'obtenir une

troisième fraction (FEC_{10mM}) constituée des glycannes biantennés et une quatrième fraction possèdant une forte affinité vis-à-vis de la ConA, regroupant les glycannes oligomannosidiques, est éluée par l'α-Me.Glc 0,3 M ($FEC_{0,3M}$).

C - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE.

1 - Sur couche mince.

Les glycannes ont été soumis à des analyses par chromatographie de couche mince avec deux objectifs : pouvoir juger de l'hétérogénéité des glycannes isolés d'une glycoprotéine et de la pureté d'un glycanne avant de déterminer sa structure primaire.

Les chromatographies s'effectuent sur plaque de gel de silice 60 (Merck) dans les solvants suivants :

- **Solvant I** : éthanol/n-butanol/pyridine/eau/acide acétique (100:10:10:30:3 ; v/v)(BAYARD et al. -260-).

- **Solvant II** : n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1 ; v/v) (PALO et SAVOLAINEN -261-)

Les oligosaccharides sont révélés après pulvérisation du réactif à l'orcinol-sulfurique (200 mg orcinol dans 100 ml d'acide sulfurique à 20 %) et chauffage à 100 °C pendant 10 min ou par autoradiographie selon la technique de LASKEY (-262-) pour les composés radioactifs.

2 - Sur papier.

Les oligosaccharides de type oligomannosidique ont été séparés par chromatographie sur papier (Whatman 3) pendant 48 h dans le système solvant de FISCHER et NEBEL (-263-) : acétate d'éthyl/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3).

3 - Par H.P.L.C.

Les glycannes oligomannosidiques ont été fractionnés par H.P.L.C. sur une colonne 5µm Amino AS-5A (0,4 x 25 cm, chromatem 33, TOUZART et MATIGNON) (PAZ-PARENTE et al. -264-), les conditions expérimentales étant les suivantes : la colonne est équilibrée dans le solvant initial acétonitrile/eau (60:40) et après l'injection (50 µl) des conditions isocratiques sont appliquées pendant 20 min suivies d'un gradient linéaire pendant 80 min pour conduire au mélange acétonitrile/eau (45:55). Le débit est de 1 ml/min, les fractions sont de 0,5 ml, une aliquote ou la totalité des fractions sont comptées en scintillation liquide selon le type de chromatographies : analytiques ou préparatives.

III - METHODOLOGIE D'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES.

A - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES.

Les protocoles expérimentaux sont ceux préconisés par MONTREUIL et SPIK (-265-) :

1 - les oses neutres totaux ont été déterminés par leur réaction avec l'orcinol sulfurique selon la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (-266-) modifiée par RIMINGTON (-267-) ;

2 - les osamines libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N 4h à 100°C) ont été dosées après neutralisation, par le procédé d'ELSON et MORGAN (-268-), modifié par BELCHER et al. (-269-) ;

3 - les acides sialiques libres ou conjugués ont été dosés par le réactif de DISCHE (-270-) à la diphénylamine, selon la méthode de WERNER et ODIN (-271-).

B - COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES.

Les rapports molaires des glucides ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, selon le procédé décrit par ZANETTA et al. (-272-). Cette technique modifiée par FOURNET et al. (communication personnelle) a pu être appliquée aux dosages des microquantités (5 à 10 µg d'oligosaccharides) : après lyophilisation, le produit est méthanolysé pendant 24 h à 80°C en prenant soin de saturer le milieu extérieur avec du méthanol chlorhydrique 0,5 N. Après évaporation sous azote, le résidu est repris par 20 µl de dichlorométhane et 20 µl d'anhydride trifluoroacétique, et le milieu extérieur est saturé avec ce même mélange réactionnel. Une étude cinétique de la réaction de trifluoroacétylation a prouvé qu'elle était complète après un séjour d'une nuit à température ambiante.

C - CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES.

Les glycoprotéines animales contiennent des acides sialiques le plus souvent sous la forme N-acylée. La nature des radicaux N-acyl semble limitée au radical N-acétyl chez l'Homme et au radical N-glycolyl chez les autres animaux. Afin de vérifier la nature des acides sialiques contenus dans le fibrinogène bovin (voir p.87), nous avons utilisé la méthode décrite par SCHAUER (-273-) qui permet de différencier les deux radicaux N-acétyl et N-glycolyl, contrairement à l'étude en chromatographie en phase gazeuse, car, dans ce dernier cas,

les radicaux N-acyl libérés par méthanolyse sont systématiquement N-réacétylés dans l'étape suivante. Cette technique consistait en une hydrolyse formique douce (ajustage du milieu réactionnel à pH 2,2 avec de l'acide formique 1N) 1 h, dans un bain marie à 70°C. Après dessalage sur résine Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) et concentration en présence de méthanol, les acides sialiques recueillis ont été soumis à une chromatographie sur couche mince sur plaque de cellulose (Merck), dans le solvant : n-butanol/n-propanol/HCl 0,1N (1;2;1 ; v/v). Les acides sialiques ont été révélés à 110°C en atmosphère humide, après pulvérisation du réactif orcinol/$FeCl_3$.

D - METHYLATION DES GLYCANNES.

La méthylation des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse, réduits ou non, a été réalisée selon la méthode de FINNE et al. (-274-). Les oligosaccharides méthylés ont été ensuite méthanolysés et peracétylés. Leur analyse a été effectuée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon le protocole décrit par FOURNET et al. (-275-).

E - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.

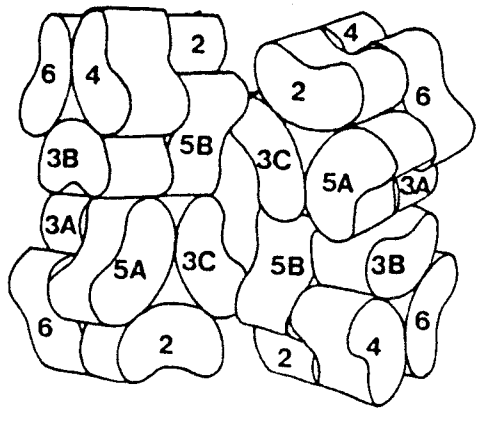
L'étude de la résonance magnétique du proton sur les oligosaccharides a été réalisée par l'équipe du Professeur J.F.G. VLIEGENTHART (Utrecht). L'analyse des oligosaccharides préalablement traités par l'eau lourde (D_2O) a été effectuée sur un appareil Bruker HX-360 à 360 MHZ et sur un appareil Bruker WM-500 à 500 MHZ. Les détails expérimentaux sont décrits dans les revues générales de VLIEGENTHART et al. (-276-, -277-).

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DU GLYCANNE DE L'HEMOCYANINE DU SCORPION *ANDROCTONUS AUSTRALIS*

Dans le cadre d'une collaboration établie avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Arthropodes Irradiés dirigé par le Professeur M. GOYFFON, au Museum National d'Histoire Naturelle, la détermination de la structure primaire des glycannes de l'hémocyanine du scorpion Androctonus australis nous a été confiée.

Les hémocyanines sont des cuproprotéines multimériques de l'hémolymphe de certains Mollusques (Gastéropodes, Céphalopodes) et de certains Arthropodes (Crustacés, Arachnides, Mérostomes) qui assurent le transport de l'oxygène. Les hémocyanines des Mollusques sont de grandes molécules cylindriques de 350 Å de diamètre, formées de chaînes polypeptidiques de 450.000 daltons tandis que, chez les Arthropodes, ces molécules résultent de l'assemblage de 1, 2, 4 ou 8 sous-unités hexamériques composées de protéines de masse moléculaire variant entre 65.000 et 95.000 daltons (VAN BRUGGEN et al. -278-).

L'hémocyanine du scorpion Androctonus australis, présente à un taux de 60 à 70 mg/ml d'hémolymphe (GOYFFON -279-), est composée de 8 chaînes polypeptidiques différentes (2, 3A, 3B, 3C, 4, 5A, 5B et 6) (LAMY et al. -280-), disposées dans une structure quaternaire formée de 4 hexamères (SIZARET et al. -281-) :



Chaque monomère possède deux atomes de cuivre et est capable de fixer une molécule d'oxygène et la molécule native possède une M.M. d'environ 1.800.000 (LAMY et al. -282-).

Les hémocyanines sont des glycoprotéines qui comportent de 4 à 9 % et de 1 à 3 % de sucres respectivement pour les Mollusques (ALBERGONI et CASSINI -283-) et les Arthropodes (MARKL et al. -284-). Les oses présents sont typiquement le mannose, la N-acétylglucosamine et le fucose, pour les Arthropodes, le galactose, la N-acétylglucosamine, le mannose, le xylose et le 3-O-CH_3-galactose pour les Mollusques (VAN HOLDE et MILLER -285-, HALL et al. -286-). VAN KUIK et al. (-287-) ont récemment déterminé la structure d'un glycanne de l'hémocyanine d'Helix pomatia qui est inusuelle :

```
Man(α1-3)\
Xyl(α1-2)——Man(ß1-4)GlcNAc(ß1-4)GlcNAc(ß1-N)Asn
                                  |  (α1-6)
                                 Fuc
Man(α1-6)/
```

Les travaux de Biochimie Comparée concernant la structure des glycannes du règne animal sont peu nombreux exceptés ceux qui sont menés sur les glycoprotéines des Mammifères et des Oiseaux (voir chapitre I; p. 9).

En ce qui concerne les Invertébrés, BUTTERS et al. (-288-) ont montré que la biosynthèse des glycoprotéines d'une lignée cellulaire établie de cellules du moustique Aedes aegypti (MOS 20A) empruntait des voies identiques à celle des Vertébrés et que l'absence de galactosyl, de glucosaminyl et de sialyltransférases entraînait le blocage de la biosynthèse au stade oligomannosidique. QUESADA ALLUE (-289-) et HSIEH et ROBBINS (-290-) ont également mis en évidence le Glc_3 Man_9 $GlcNAc_2$-P-P-Dol donneur respectivement chez la Drosophile et dans des cellules C6/36 du moustique Aedes albopictus. Les structures glycanniques trouvées chez les Insectes sont de type oligomannosidique, allant de Man_9 $GlcNAc_2$ à Man_5 $GlcNAc_2$ pour les cellules C6/36 (HSIEH et ROBBINS -291-) et essentiellement Glc_3 Man_9 $GlcNAc_2$ pour les cellules MOS 20A (BUTTERS et HUGHES -292-).

Disposant d'une préparation d'hémocyanine du scorpion Androctonus australis fournie par Monsieur le Docteur M. GOYFFON, nous avons entrepris l'étude structurale de la partie glycannique afin de vérifier si cette "simplification" des structures glucidiques était bien un marqueur de l'évolution généralisable à tous les Arthropodes. Le mémoire suivant rapporte les résultats de cette étude. Il est soumis pour publication au périodique Carbohydrate Resarch dans le fascicule édité en l'honneur du Professeur Roger W. JEANLOZ. Il a fait l'objet d'une communication au VIIIth International Symposium on Glycoconjugates à Houston (Texas) en septembre 1985.

PRIMARY STRUCTURE OF THE OLIGOSACCHARIDE MOIETY OF HEMOCYANIN FROM THE SCORPION *ANDROCTONUS AUSTRALIS*.*+

Philippe DEBEIRE and Jean MONTREUIL

Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex (France)

Max GOYFFON

Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Arthropodes Irradiés, 57 rue Cuvier, 75000 Paris (France)

Albert J. VAN KUIK, Herman VAN HALBEEK and Johannes F.G. VLIEGENTHART

University of Utrecht, Department of Bio-Organic Chemistry, Croesestraat 79, 3522 AD Utrecht (The Netherlands)

---

* Dedicated to Roger W. JEANLOZ

+ Presented at the 8th International Symposium on Glycoconjugates, Houston, Texas, USA, 9-13 September, 1985

ABSTRACT

Hemocyanin, the copper-containing glycoprotein that serves as an oxygen carrier in the hemolymph of some Arthropods and Molluscs, was obtained from the blood of the scorpion *Androctonus australis*. Sugar analysis of the glycoprotein revealed that its carbohydrate moiety is of the N-glycosidic type. The carbohydrate chains were released from the protein by hydrazinolysis. Determination of the molecular weight and carbohydrate composition, in conjunction with methylation analysis and 500-MHz ^{1}H-n.m.r. spectroscopy of the oligosaccharides, allowed to deduce that this hemocyanin contains glycans of the oligomannosidic-type. Their structures were found to be homogeneous ; all isolated chains were identified as $Man_9GlcNAc_2$. The number of chains per molecule is 8. The finding of (non-processed) oligomannoside-type structures in scorpion hemocyanin fits the proposal (R.C. Hughes and T.D. Butters, Trends Biochem. Sci. (1981) 228-230) that glycosylation of a protein is an evolutionary marker.

INTRODUCTION

Hemocyanins are high-molecular-weight, copper-containing oxygen carriers freely dissolved in the hemolymph of Arthropods and Molluscs [1]. The hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis* is a (4 x 6)-mer protein built from eight types of polypeptide chains [2,3].

The carbohydrate content of hemocyanins is 1 to 3 % (w/w) and 4 to 9 % (w/w) for arthropods [4-6] and molluscs [7,8], respectively. With regard to arthropod hemocyanins, mannose and N-acetylglucosamine are typical of their carbohydrate composition [9].

In the present paper, we describe the primary structure determination of the oligosaccharide moiety of the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis* by methylation analysis and by 500-MHz ^{1}H-n.m.r. spectroscopy.

EXPERIMENTAL

Blood from the scorpion *Androctonus australis garzonii* [10] was collected by cardiac puncture and centrifuged for 10 min at 800 g to remove blood cells. Hemocyanin was isolated by gel filtration on Sepharose 2B by using Tris-HCl, pH 7.2, 2 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$ [11]. A lyophilized hemocyanin preparation (60 mg) was hydrazinolysed [12] and the liberated, N-deacetylated glycans were N-reacetylated, partly with [^{14}C] acetic anhydride [13]. The glycans were analysed by thin-layer chromatography on Silica Gel 60 plates with the solvent system : butan-1-ol/acetic acid/water (2:1:1 ; by vol.) [14] and visualised by using an orcinol spray reagent (200 mg of orcinol in 100 ml of 20 % sulfuric acid) with heating at 110°C for 10 min. Oligomannoside-type oligosaccharides (M_2 to M_9) containing two to nine mannose residues with the general structure $Man_{(1-8)}$ Man(β1-4)GlcNAc, isolated from patients with mannosidosis [15], were used as reference oligosaccharides.

For methanolysis, methylation and ^{1}H-n.m.r. studies, the hemocyanin-derived carbohydrates were reduced by the addition of 5 mg sodium borohydride. After 2 h, the reaction mixture was neutralized with Dowex 50 x 8 (25-50 mesh ; H^+) and the boric acid removed by distillation with methanol. The carbohydrate content and the molar ratio of constituting monosaccharides of the intact glycoprotein and of its reduced product of hydrazinolysis were determined after methanolysis and trifluoroacetyla-

tion by gas-liquid chromatography [16]. Exhaustive methylation of the reduced oligosaccharides was carried out according to 17. The methyl glycosides obtained by methanolysis of permethylated oligosaccharides were peracetylated and identified by gas-liquid chromatography coupled to mass-spectrometry as described in 18.

Prior to ^{1}H-n.m.r. spectroscopic analysis, the sample was repeatedly treated with D_2O at pD 6-7 and room temperature. 500-MHz ^{1}H-n.m.r. spectroscopy was performed using a Bruker WM-500 spectrometer (SON hf-n.m.r. facility, Department of Biophysical Chemistry, University of Nijmegen, The Netherlands) operating in the pulsed Fourier-transform mode at a probe temperature of 27°C [19]. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone (δ = 2.225 ppm in D_2O at 27°C).

RESULTS AND DISCUSSION

Carbohydrate composition of Androctonus australis hemocyanin.- The total carbohydrate content of *Androctonys australis* hemocyanin was found to be rather low : 0.8 % by weight ; this is in reasonable accord with the values (1-2 %) mentioned for other arthropod hemocyanins [7,8]. The occurrence of just Man and GlcNAc (Table 1) as sugar constituents of the initial glycoprotein and of the glycans liberated by hydrazinolysis is characteristic of N-type glycans of the oligomannosidic-type. The minute amount of galactose present in the initial glycoprotein could not be detected after hydrazinolysis anymore.

Thin-layer chromatography of the oligosaccharides.- The oligosaccharides released from hemocyanin by hydrazinolysis and N-reacetylation appeared to be homogeneous by thin-layer chromatography and exhibit a slightly lesser mobility than the urinary oligomannoside-type oligosaccharide $Man_9GlcNAc$ (Fig. 1). This is in accordance with the presence of an additional GlcNAc residue in the hemocyanin glycan.

Primary structure determination of the oligosaccharides.- The primary structure of the glycan from *Androctonus australis* was established by 500-MHz ^{1}H-n.m.r. spectroscopy. 500-MHz ^{1}H-n.m.r. spectra of the glycan (H) were recorded of neutral D_2O solutions at two different probe temperatures (27°C and 60°C). Relevant n.m.r. parameters are listed in Table 2. Those data comprised a set of structural-reporter-group signals which were identical with those reported for the $Man_9GlcNAcGlcNAc$-ol component (F1) present in the reduced hydrazinolysate from sheep prostaglandin endoperoxide synthase [20]. The absence of any lower-intensity anomeric signals in the region $4.8 < \delta < 5.5$, other than those listed in Table 2, indicated that no partial structures of the complete Man_9-GlcNAcGlc- NAc-ol were present.

These results were confirmed by permethylation analysis. The results of the latter are compiled in Table 3.

CONCLUSION

Based on the results of n.m.r. and methylation analysis, the primary structure of the oligosaccharide moiety of *Androctonus australis* hemocyanin is proposed to be as shown in Fig. 2. This structure is common to numerous glycoproteins of different origins, exhibiting different roles, i.a. calf thyroglobulin unit A [21], human myeloma IgM [22], chinese

hamster ovary cell glycoproteins [23], soybean agglutinin [24], bovine lactotransferrin [25], and sheep prostaglandin endoperoxide synthase [20].

Moreover, *Androctonus australis* hemocyanin is a 24-mer protein built from eight types of polypeptide chains, each of which having a relative molecular mass of about 75,000 [2,3]. Hence, the total carbohydrate content of hemocyanin of 0.8 % by weight indicates the presence of about eight glycans per molecule.

It is worth noting that only the complete $Man_9GlcNAc_2$ has been found in the *Androctonus australis* hemocyanin. Apparently, no trimming occured, raising an interesting point as to glycoprotein evolution. N-glycosylation of proteins is an universal feature of eucaryotic organisms. The asparagine-linked oligosaccharides can be subdivided into oligomannosidic-type and, after oligosaccharide processing followed by a series of elongation reactions, into hybrid and N-acetyllactosamine-type [26]. Hugues *et al.* [27,28] have found only oligomannosidic-type glycans in the major glycoprotein of mosquito cell plasma membranes. In contrast N-acetyllactosamine-type glycans are abundant in vertebrate cells. Those results are consistent with later findings of Hsieh and Robbins [29] who suggest that a similar processing pathway may be characteristic of all insects. The oligomannoside nature of N-glycosidic type glycan of scorpion hemocyanin is in accordance with the proposal implicating that glycosylation is an evolutionary marker [30].

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.A. n° 217), by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON), with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and by grant UUKC 83-13 from the Netherlands Cancer Foundation (KWF). We thank Yves Leroy for his expert technical assistance.

REFERENCES

1 J. LAMY, M.M.C. BIJLHOLT, P.J. SIZARET , J. LAMY and E.F.J. VAN BRUGGEN, *Biochemistry*, 20 (1981) 1849-1856.

2 J. LAMY, J. LAMY and J. WEILL, *Arch. Biochem. Biophys.* 193 (1979) 140-149.

3 P.Y. SIZARET, J. FRANK, J. LAMY, J. WEILL and J.N. LAMY, *Eur. J. Biochem.*, 127 (1982) 501-506.

4 J.S. LOEHR and H.S. MASON, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 51 (1973) 741-745.

5 J. MARKL, R. SCHMID, S. CZICHOS-TIEDT and B. LINZEN, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 (1976) 1713-1725.

6 L.M. HAMLIN and W.W. FISH, *Bioch. Biophys. Acta*, 491 (1977) 46-52.

7 V. ALBERGONI and A. CASSINI, *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 46 (1970) 936-938.

8 K.E. VAN HOLDE and E.F.J., in S.N. TIMASHEFF and G.D. FASMAN (Eds), *Subunits in biological systems*, Dekker, New York, 1971, pp. 1-53.

9 K.E. VAN HOLDE and K.I. MILLER, *Q. Rev. Biophys.*, 15 (1982) 1-129.

10 M. GOYFFON and J. LAMY, *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 98 (1973) 137-144.

11 N. HUYART, R. CALVAYRAC, J. BRIAND, M. GOYFFON and M. VUILLAUME, *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B (1983) 153-159.

12 B. BAYARD and J. MONTREUIL, in J. MONTREUIL (Ed.), *Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués, Coll. Intern. C.N.R.S. n° 221*, C.N.R.S., Paris, 1974, pp. 209-218.

13 C.L. READING, E. PENHOET and C. BALLOU, *J. Biol. Chem.*, 253 (1978) 5600-5612.

14 J. PALO and H. SAVOLAINEN, *J. Chromatogr.*, 65 (1972) 447-450.

15 G. STRECKER, B. FOURNET, S. BOUQUELET, J. MONTREUIL, J.L. DHONDT and J.P. FARRIAUX, *Biochimie*, 69 (1976) 579-586.

16 J.P. ZANETTA, W.C. BRECKENRIDGE and G. VINCENDON, *J. Chromatogr.*,69 (1972) 291-301.

17 J. FINNE, T. KRUSIUS and H. RAUVALA, *Carbohydr. Res.*, 80 (1980) 336-339.

18 B. FOURNET, G. STRECKER, Y. LEROY and J. MONTREUIL, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502.

19 J.F.G. VLIEGENTHART, L. DORLAND and H. VAN HALBEEK, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.

20 J.H.G.M. MUTSAERS, H. VAN HALBEEK, J.P. KAMERLING and J.F.G. VLIEGENTHART, *Eur. J. Biochem.*, 147 (1985) 569-574.

21 S. ITO, K. YAMASHITA, R.G. SPIRO and A. KOBATA, *J. Biochem. (Tokyo)* 81 (1977) 1621-1631.

22 A. CHAPMAN and R. KORNFELD, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 824-828.

23 E. LI and S. KORNFELD, *J. Biol. Chem.* , 254 (1979) 1600-1605.

24 L. DORLAND, H. VAN HALBEEK and J.F.G. VLIEGENTHART, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 7708-7711.

25 H. VAN HALBEEK, L. DORLAND, J.F.G. VLIEGENTHART, G. SPIK, A. CHERON and J. MONTREUIL, *Biochim. Biophys. Acta*, 675 (1981) 293-296.

26 J. MONTREUIL, *Pure & Appl. Chem.*, 42 (1975) 431-477 ; in A. NEUBERGER and L.L.M. VAN DEENEN (Eds.), *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 19B, Elsevier, Amsterdam, 1982, pp. 1-188.

27 T.D. BUTTERS and R.C. HUGHES, *Biochim. Biophys. Acta*, 640 (1982) 655-671.

28 T.D. BUTTERS, R.C. HUGHES and P. VISCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 640 (1981) 672-686.

29 P. HSIEH and P.W. ROBBINS, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 2375-2382.

30 R.C. HUGHES and T.D. BUTTERS, *Trends Biochem. Sci.*, 6 (1981) 228-230

TABLE I

MOLAR RATIOS OF MONOSACCHARIDE FOR INITIAL *ANDROCTONUS AUSTRALIS* HEMOCYANIN AND ITS GLYCAN OBTAINED AFTER HYDRAZINOLYSIS, N-REACETYLATION AND REDUCTION(H).

Monosaccharide	*Initial glycoprotein*	*Hydrazinolysate (H)*
Man	8.8	8.2
Gal	0.2	0
GlcNAc[a]	2.0	1.0
GlcNAc-ol	0	0.45

[a] Calculated on the basis of two and one GlcNAc residues respectively.

TABLE III

MOLAR RATIOS[a] OF MONOSACCHARIDE METHYL ETHERS PRESENT IN THE METHANOLYSATE OF THE PERMETHYLATED GLYCAN ISOLATED FROM *ANDROCTONUS AUSTRALIS* HEMOCYANIN.

BU LILLE

Monosaccharide methyl ether	*Molar ratio*
(2, 3, 4, 6)-Me_4-Man	2.8
(3, 4, 6)-Me_3-Man	4.0
(2, 4)-Me_2-Man	2.6
(3, 6)-Me_2-GlcN(Me)Ac	1.0
(1,3,5,6)-Me_3-GlcN(Me)Ac-ol	0.3

[a] Calculated on the basis of 4 residues of (3,4,6)-Me_3-Man

TABLE II

^{1}H CHEMICAL SHIFTS OF STRUCTURAL-REPORTER-GROUP PROTONS OF THE CONSTITUENT MONOSACCHARIDES FOR THE OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL (H) DERIVED FROM *ANDROCTONUS AUSTRALIS* HEMOCYANIN, TOGETHER WITH THOSE FOR REFERENCE COMPOUND F1[20]

Reporter group	Residue[a]	Chemical shift[b] in F1	Chemical shift[b] in H
NAc of	1-ol	2.055	2.055
	2	2.067	2.067
H-1 of	2	4.630	4.643
	3	4.77	4.780[d]
	4	5.333	5.334
	4'	4.867	4.861
	A	5.400	5.400
	B	5.140	5.140
	C	5.307	5.306
	D_1	5.045	5.039
	D_2	5.054	5.054
	D_3	5.038	5.039
H-2 of	1-ol	4.232	4.232
	3	4.232	4.232
	4	4.094	4.096
	4'	4.153	4.152
	A	4.104	4.106
	B	4.020	4.014
	C	4.104	4.106
	D_1	4.071[c]	4.068
	D_2	4.068[c]	4.068
	D_3	4.064[c]	4.068

[a] For coding of monosaccharide residues and complete structure, see Fig. 2.

[b] Chemical shifts are given for neutral solutions at 27°C in ppm downfield from internal DSS in D_2O.

[c] Assignments may have to be interchanged.

[d] Chemical shift was measured at 60°C.

BU LILLE

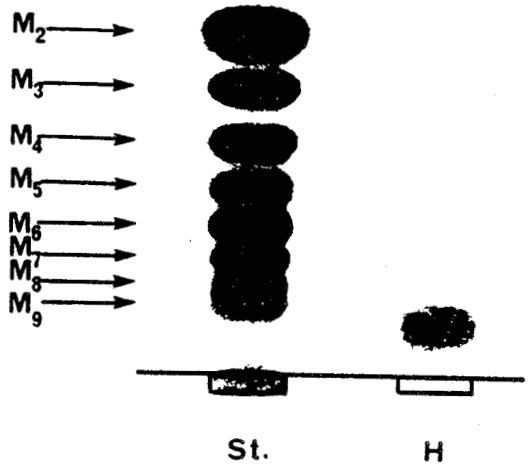
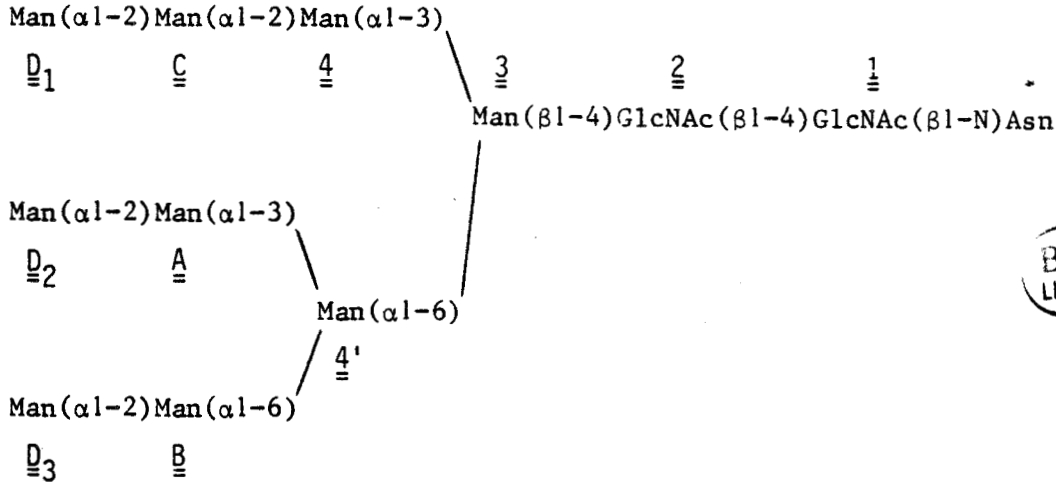


Fig. 1. Thin-layer chromatography of the glycan liberated by hydrazinolysis from *Androctonus australis* hemocyanin (H) and of the mixture of the oligomannosidic type oligosaccharides M_2 to M_9 used as standards (St). For details of the experimental procedure, see "Experimental".



BU LILLE

Fig. 2. Primary structure of the oligomannosidic type carbohydrate chain from *Androctonus australis* hemocyanin.

Nous avons pu déterminer, en associant la technique de la méthylation et la spectroscopie en R.M.N. du proton à 500 MH_z, la structure primaire du glycanne de l'hémocyanine du scorpion Androctonus australis qui correspond au glycanne oligomannosidique Man_9 $GlcNAc_2$. On trouve cette structure dans la thyroglobuline de veau (ITO et al. -293-), les immunoglobulines M myélomateuses (CHAPMAN et KORNFELD -294-), la lactotransferrine de Vache (VAN HALBEEK et al. -295-), l'agglutinine de soja (LIS et SHARON -296-), l'endopéroxyde prostaglandine synthétase de Mouton (MUTSAERS et al. -297-) et également chez les Insectes, chez qui on ne trouve que des structures de type oligomannosidique, ce qui tend à prouver que cette simplification structurale serait généralisable aux Arthropodes. Il serait capital de vérifier si les enzymes responsables de la maturation des glycannes (α-mannosidases ou glycosyltransférases) sont absentes chez le Scorpion, ce qui expliquerait ce blocage de la synthèse des glycoprotéines.

Quelle est la signification biologique de ce glycanne présent à raison de 8 à 9 chaînes oligosaccharidiques par molécule d'hémocyanine ? Pour essayer de répondre à cette question, on peut se référer aux travaux récents de NORDIN et al. (-298-) qui ont étudié les substances vitellines d'une blatte : Blattella germanica. Ces composés sont des phospholipoglycoprotéines, comportant des glycannes de type oligomannosidique (essentiellement des oligosaccharides Glc_1 Man_9 $GlcNAc_2$ et Man_{7-9} $GlcNAc_2$), synthétisées dans le corps gras, excrétées dans l'hémolymphe et captées par les oocytes. Ces auteurs ont montré, en inhibant leur glycosylation dans le corps gras par la tunicamycine, que ces protéines restaient sous la forme d'un précurseur de haut poids moléculaire qui ne subissait pas les protéolyses spécifiques habituelles conduisant à la molécule mature sécrétée. C'est par la réalisation de telles expérimentations sur l'hépatopancréas du Scorpion, lieu de synthèse de l'hémocyanine, que nous pourrions vérifier s'il existe également des relations entre la glycosylation de l'hémocyanine, sa sécrétion et/ou la formation de sa structure quaternaire.

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES MAJEURS DU FIBRINOGENE BOVIN

Le fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique impliquée dans la coagulation sanguine. Sous l'action de la thrombine, il est converti en monomères de fibrines qui se polymérisent non-enzymatiquement et forment la fibrine insoluble, sous l'action du facteur XIII activé.

Le rôle de leurs glycannes dans ces processus n'a pas été clairement établi. Selon NISHIBE et TAKAHASHI (-299-), l'élagage des glycannes du fibrinogène par voie enzymatique ne modifie pas le temps de coagulation tandis que LAKI et MESTER (-300-) ont montré que sa désialylation induisait la formation d'un gel modifié. MIZUOCHI et al. (-301-) n'ont pas retrouvé de différences qualitatives ou quantitatives entre les glycannes de fibrinogène humain normal et ceux d'un fibrinogène pathologique (Nagoya), présentant la particularité d'induire une polymérisation défectueuse des monomères de fibrine.

TOPFER - PETERSEN (-302-) et MIZUOCHI et al. (-303-) avaient montré que les glycannes du fibrinogène humain étaient de type N-acétyllactosaminique, biantennés mono- et disialylés, mais nous ne disposions que de peu d'éléments sur la structure des glycannes du fibrinogène bovin. Seuls, TOPFER - PETERSEN et HENSCHEN (-304-) avaient précisé sa composition en monosaccharides.

Le Docteur E. MOCZAR du Laboratoire du Tissu Conjonctif de la Faculté de Médecine de Créteil nous avait confié une préparation de glycopeptides isolés à partir de fibrinogène bovin en vue de déterminer la structure primaire de leurs glycannes.

Deux glycannes majeurs, biantennés, mono et disialylés, représentant 38 et 39 % des oligosaccharides totaux ont été isolés et leurs structures primaires ont été déterminées sur les bases des résultats issus de la technique de la méthylation et des analyses en R.M.N. du proton à 360 MHz (voir Figure 3, p.92). La seule ambiguïté subsistante réside dans le fait que nous n'avons pu positionner les résidus d'acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques sur les chaînes oligosaccharidiques, l'emploi de l'hydrazine faisant disparaître cette hétérogénéité par libération des groupements acétyl et glycolyl.

En outre, la quantité relativement importante de glycopeptides dont nous disposions nous a permis de vérifier que l'hydrazinolyse était bien quantitative et ne provoquait pas de modifications majeures des glycannes, comme des désialylations partielles.

La publication suivante rapporte l'ensemble des principaux résultats de cette étude.

Eur. J. Biochem. *151*, 607–611 (1985)
© FEBS 1985

Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen

Philippe DEBEIRE [1], Jean MONTREUIL [1], Elémer MOCZAR [2], Herman VAN HALBEEK [3] and Johannes F. G. VLIEGENTHART [3]

[1] Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique 217, Villeneuve d'Ascq Cédex

[2] Université de Paris XII, Faculté de Médecine, Laboratoire du Tissu Conjonctif et Groupe de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique 40, Créteil

[3] Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht

(Received January 29/May 18, 1985) – EJB 85 0102

After pronase digestion of bovine fibrinogen, the asparagine-linked glycans were released from the resulting glycopeptides by hydrazinolysis, and subsequently re-*N*-acetylated. Two sialylated glycans were isolated by ion-exchange chromatography. Their primary structure has been determined by methylation analysis and 360-MHz ^{1}H-NMR spectroscopy. The structures proposed to be present in the native glycoprotein are as follows:

NeuAc/NeuGc(α2→6)Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→3) ⟍
⟍ Man(β1→4)GlcNAc(β1→4)GlcNAc(β1→N)Asn
[NeuAc/NeuGc(α2→6)]$_{0-1}$Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→6) ⟋

Fibrinogen and fibrin from a number of animal species are glycoproteins [1]. The biological role of their glycan moieties is not yet clear despite active investigations in this field. For example, it has been reported that neutral carbohydrates [2] or sialic acid [3] are released during clotting but a number of investigations were unable to confirm these results [4, 5]. The decrease in coagulability of fibrinogen after periodate oxidation of glycans also suggested a role of the latter in the clotting process [6]. This finding has since been critized, as the reduction of the clotting time may be due to oxidation of some amino acid residues [7]. Recently, it was demonstrated that the enzymatic removal of glycans does not change the clotting time of fibrinogen [8].

Study of pathological cases did not bring more information about the relationship between sugars and clotting. In fact congenitally abnormal fibrinogens [9–11] have in some cases a lower carbohydrate content than normal ones but is seems that the primary cause of these coagulation disturbances is an amino acid substitution. However, sialic-acid-free fibrinogen forms a gel different from the normal protein [12] and yields urea-soluble fibrin in the presence of factor XIII [13]. These findings suggest that the carbohydrate in fibrinogen could play a role in the complex polymerisation process.

Attempts to clarify the structure of the glycan of bovine fibrinogen were done earlier by Mester et al. [14, 15], but due to the poor performances of the analytical methods used at that time, the authors did not obtain exact determination of the structure. The present paper describes the primary structure of the two major glycans of bovine fibrinogen determined by methylation analysis and 360-MHz ^{1}H-NMR spectroscopy.

Correspondence to J. Montreuil, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS n° 217, Université des Sciences et Techniques, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Abbreviations. Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; Man, D-mannose; NeuAc, *N*-acetyl-D-neuraminic acid; NeuGc, *N*-glycolyl-D-neuraminic acid.

MATERIALS AND METHODS

Bovine fibrinogen type I (75% protein-clottable) and type IV (95% protein-clottable), pronase and *N*-glycolyl-neuraminic acid were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Ultrogel AcA 202 was obtained from IBF (Paris, France). Anion-exchanger AG1-X2 (minus 400 mesh) and Bio-Gel P-2 (200–400 mesh) were furnished by Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Anhydrous hydrazine was from Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA). Silica Gel 60 thin-layer plates (0.2 mm layer) were from Merck (Darmstadt, FRG). The sialylated oligosaccharides used as standards for thin-layer chromatography were isolated from urine of a patient with sialidosis and are a gift from Dr G. Strecker. Their primary structure is as follows [16]: oligosaccharide I: NeuAc(α2→6)Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→3)[NeuAc(α2→6)Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→6)]Man(β1→4)GlcNAc; oligosaccharide II: NeuAc(α2→6)Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→3)[Gal(β1→4)GlcNAc(β1→2)Man(α1→6)]Man(β1→4)GlcNAc.

Preparation of the glycopeptides

Fibrinogen type I (25 g) was digested by 0.5 g pronase as previously described [14]. The pronase was preincubated for 1 h at 49 °C to destroy glycosidase activities [17]. Pronase was removed by trichloroacetic acid at 4 °C [18] and the bulk of the acid was extracted by diethyl ether. The solution was neutralized with ammonium hydroxide, concentrated by evaporation *in vacuo* and chromatographed on Ultrogel AcA 202 column (60 × 5 cm). Elution was done with 0.1 M aqueous acetic acid. Sugars were detected by a phenol/sulfuric acid reagent [19] and the fractions containing sugars were pooled

and lyophilized. Glycopeptides were prepared in a similar way from 1 g of fibrinogen sample Sigma type IV, using a 60 × 1 cm Ultrogel AcA 202 column for the separation of the glycopeptides. The finger-printing of the glycopeptide mixture on silica thin-layers was realised as described [20].

Hydrazinolysis

Lyophilized glycopeptides were hydrazinolysed according to Bayard et al. [21]: the sample (30 mg) was dried *in vacuo* over P_2O_5 and heated in a glass sealed tube with 500 µl anhydrous hydrazine for 20 h at 105°C. The excess of hydrazine was evaporated under nitrogen. The evaporation was repeated twice after addition of a few drops of toluene. The residual hydrazine was eliminated *in vacuo* over H_2SO_4. The liberated oligosaccharides were desalted on a column (1 × 50 cm) of Bio-Gel P-2 (200–400 mesh) and eluted with acetic acid (1%) in water. The carbohydrate fractions were visualized by the phenol/sulfuric acid reagent [19]. After elimination of acetic acid by evaporation *in vacuo*, the oligosaccharides were re-*N*-acetylated with acetic anhydride according to Reading et al. [22] and subsequently desalted as described above. The non-desialylation of the glycans during the hydrazinolysis/re-*N*-acetylation procedure was checked by the diphenylamine reagent [23] after each passage over Bio-Gel P-2 columns.

Separation of sialyloligosaccharides by ion-exchange chromatography

The oligosaccharide fraction obtained was submitted to ion-exchange chromatography on a column (20 × 1 cm) of AG1-X2 (minus 400 mesh, acetate form) equilibrated in water. Elution was performed with pyridine/acetic acid buffer pH 5 using a continuous gradient of ionic strength from 0–400 mM at a flow rate of 10 ml/h.

Thin-layer chromatography

Thin-layer chromatography of the oligosaccharides was performed on Silica Gel 60 plates during 5 h with the solvent system: pyridine/ethanol/acetic acid/*n*-butanol/water (10:100:3:10:30, by vol.) [24] and visualized with an orcinol/sulfuric acid reagent (200 mg orcinol in 100 ml of 20% sulfuric acid).

Determination of the structure of the sialyloligosaccharides

The molar carbohydrate composition of the sialyloligosaccharides was determined by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [25]. Sialic acids were identified and determined according to Schauer [26]. Permethylation was carried out according to Finne et al. [27] and the methyl glycosides were separated by gas-liquid chromatography before (for neutral monosaccharides) and after (for neutral monosaccharides and hexosamines) peracetylation according to Fournet et al. [28]. For ^{1}H-NMR spectroscopic analysis the oligosaccharides were repeatedly exchanged in ^2H_2O (99.96 mol% ^{2}H, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) at room temperature with intermediate lyophilization. The 360-MHz ^{1}H-NMR spectra were recorded on a Bruker HX-360 spectrometer (SON NMR facility, Groningen, The Netherlands), operating in the Fourier transform mode, at a probe temperature of 25°C [29]. Chemical shifts are given relative to internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone (δ = 2.225 ppm, with an accuracy of 0.003 ppm.

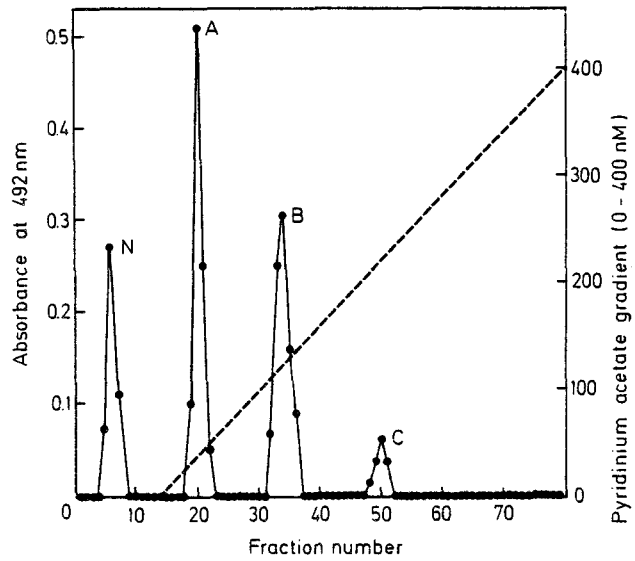


Fig. 1. *Ion-exchange chromatography on AG 1-X2 (minus 400 mesh) of oligosaccharides liberated from fibrinogen glycopeptides by hydrazinolysis and re-*N*-acetylation.* For details, see Materials and Methods

Preparation of glycopeptides

25 g of bovine fibrinogen type I yielded 450 mg of a purified glycopeptide mixture. The patterns obtained by chromatography on silica thin-layers [20] of the glycopeptides from fibrinogen samples with 75% (type I) or of 95% (type IV) clottable protein were similar. It was decided to carry out the structural studies on the glycopeptide mixture prepared from the type I sample.

RESULTS

Sialic acid characterization

N-Acetyl and *N*-glycolyl neuraminic acids were found to be present in the glycopeptides in equal proportions. As hydrazinolysis removes all *N*-acyl groups (acetyl and glycolyl) and since re-*N*-acetylation is achieved with acetic acid anhydride, the native heterogeneity is lost during this treatment and the liberated glycans contain only *N*-acetylneuraminic acid [30].

Isolation of glycans

The ion-exchanger chromatography of glycans obtained by hydrazinolysis and re-*N*-acetylation afforded two major fractions (fractions A and B), which were eluted with 40 and 120 mM pyridine/acetic acid buffer, respectively, and two minor fractions, a non-retained neutral one (fraction N) and one eluted with 220 mM pyridine/acetic acid buffer (fraction C) (Fig. 1). The fractions N, A, B and C represented 16%, 38%, 39% and 7% of the total oligosaccharide content, respectively. Fractions A and B were homogeneous on thin-layer chromatography (Fig. 2) and migrates as the monosialylated (oligosaccharide II) and the disialylated (oligosaccharide I) standards, respectively.

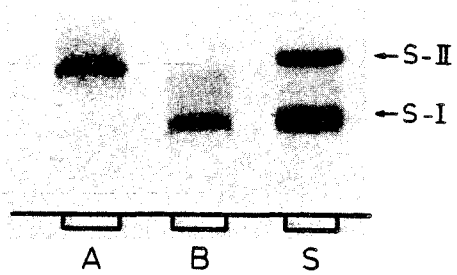


Fig. 2. *Thin-layer chromatography of the mixtures (S) of standard oligosaccharides I (S-I) and II (S-II) and of fractions A and B isolated by ion-exchange chromatography.* For details, see Materials and Methods

Table 1. *Molar carbohydrate composition of the fibrinogen glycopeptides and of the oligosaccharides obtained by hydrazinolysis and separated by ion-exchange chromatography (fractions A and B)*
The molar ratios were calculated on the basis of three mannose residues

Monosaccharide	Glycopeptides	Fraction A	Fraction B
Gal	2.2	2.1	2.1
Man	3.0	3.0	3.0
Fuc	0.0	0.0	0.0
GlcNAc	3.6 (4)	3.6 (4)	3.6 (4)
NeuAc	0.85	1.1[a]	2.1[a]
NeuGc	0.85	–[a]	–[a]

[a] Only *N*-acetylneuraminic acid is present since hydrazinolysis removed acetyl and glycolyl groups and re-*N*-acetylation fully re-*N*-acetylated the neuraminic acid residues.

Table 2. *Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of the fibrinogen glycopeptides (fractions A and B)*
The molar ratios were calculated on the basis of two residues of 3,4,6-Me_3-Man

Monosaccharide methyl ether	Fraction A	Fraction B
2,3,4,6-Me_4-Gal	1.0	0.0
2,3,4-Me_3-Gal	1.0	1.9
3,4,6-Me_3-Man	2.0	2.0
2,4-Me_2-Man	1.0	1.1
3,6-Me_2-GlcNAc(NMe)	3.5	3.4
4,7,8,9-Me_4-NeuAc(Me)	1.0	1.9

Table 3. *^1H chemical shifts of structural-reporter-group protons of constituent monosaccharides for two major sialyloligosaccharides derived from bovine fibrinogen*
Chemical shifts were acquired at 360 MHz, for solutions of the oligosaccharides in ^2H_2O, at $p^2H \approx 2$ and at 25°C

Reporter group	Residue	Chemical shift in	
		oligosaccharide A	oligosaccharide B
		ppm	
H-1 of	GlcNAc-1	5.189 (α) 4.72 (β)	5.187 (α) 4.72 (β)
	GlcNAc-2	4.608	4.605
	Man-3	4.773	4.776
	Man-4	5.137	5.133
	Man-4′	4.932	4.947
	GlcNAc-5	4.608	4.605
	GlcNAc-5′	4.583	4.605
	Gal-6	4.449	4.447
	Gal-6′	4.473	4.447
H-2 of	Man-3	4.257	4.257
	Man-4	4.196	4.197
	Man-4′	4.115	4.117
H-3ax of	NeuAc(α2→6)	1.774	1.763[a]
H-3eq of	NeuAc(α2→6)	2.659	2.663[a]
NAc of	GlcNAc-1	2.037	2.037
	GlcNAc-2	2.083	2.082
	GlcNAc-5	2.070	2.070
	GlcNAc-5′	2.047	2.066
	NeuAc	2.031	2.031[b]

[a] Signal of two protons.
[b] Signal of two methyl groups.

Primary structure of oligosaccharides A and B

The primary structure of the two major glycans A and B of bovine fibrinogen was established by 360-MHz ^1H-NMR spectroscopy in combination with sugar analysis and permethylation studies. The carbohydrate compositions of A and B are compiled in Table 1, the results of permethylation analysis in Table 2 and the pertinent ^1H-NMR data in Table 3.

The 360-MHz ^1H-NMR spectra of ^2H_2O solutions of oligosaccharides A and B are very similar to those of the mono-(α2–6)-sialylated and di-(α2–6)-sialylated oligosaccharides A3a and A4 from human meconium [31], respectively. It should be mentioned, that the structures of A3a and A4 are identical to those of oligosaccharides II and I, respectively, from sialidosis urine which were used as standards for thin-layer chromatography in this study. The above spectral resemblances indicate the branching pattern of both A and B glycans to be biantennary, and the NeuAc residues glycan in A to be located in the (α1–3)-linked, upper branch [29, 31].

It should be noted that the spectra of fibrinogen oligosaccharides A and B were recorded for ^2H_2O solutions at $p^2H \approx 2$. At this relatively low p^2H, a small amount of sialic acid had been split off. Concomitantly, the structural-reporter-group signals of the desialylated analogue of A and the partially desialylated counterpart of oligosaccharide B are

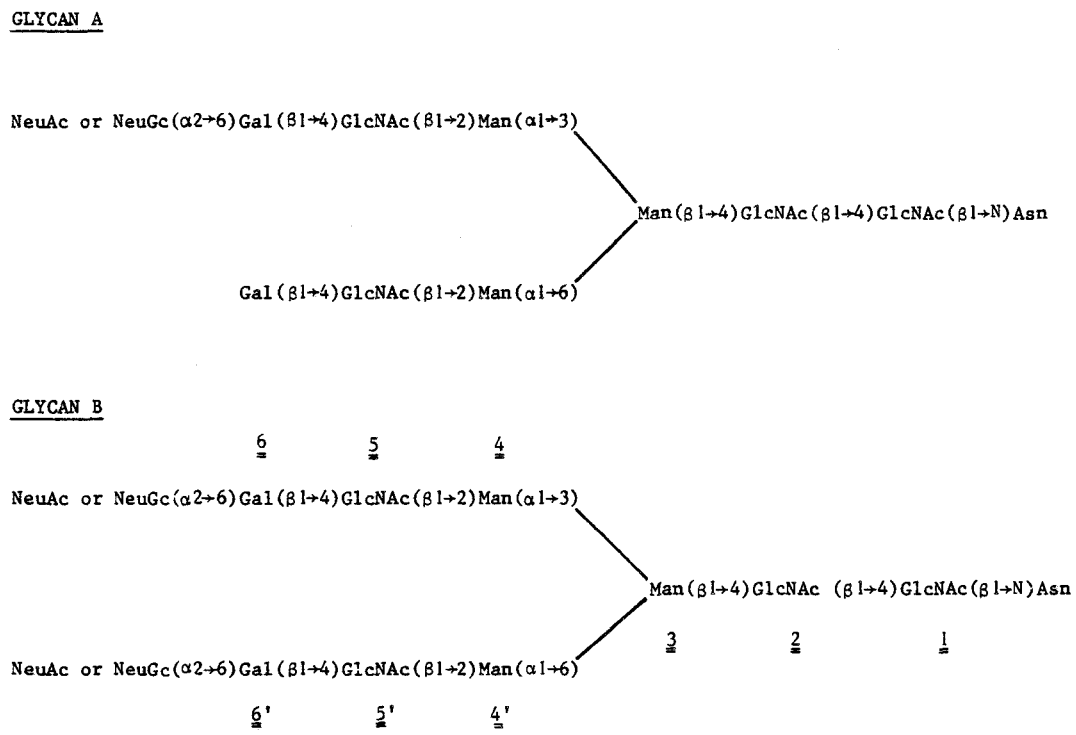


Fig. 3. *Primary structure of the two major glycans from bovine fibrinogen*

observable. The structural-reporter-group signals of free sialic acid, which occurs mainly ($\approx$ 92%) in the β-anomeric form under the applied conditions, at $p^2H \approx 2$ are observed at δ = 1.872 ppm (H-3ax, doublet of doublets), δ = 2.304 ppm (H-3eq, doublet of doublets) and at δ = 2.050 ppm (NAc, singlet) (for p^2H influences on these chemical shifts, see [32, 33]).

Besides this contamination, an important difference between the spectra of the fibrinogen oligosaccharides and the corresponding ones from meconium/sialidosis urine originates from this low p^2H value. The chemical shifts of the H-3ax and H-3eq signals of the glycosidically linked sialic acid residues are influenced by the p^2H value of the solution. For glycans A and B, δH-3ax $\approx$ 1.77 ppm and δH-3eq $\approx$ 2.66 ppm are observed (see Table 3), while for neutral solutions δH-3ax $\approx$ 1.72 ppm and δH-3eq $\approx$ 2.67 ppm are found [29, 33]. Nonetheless, it can be concluded that the NeuAc residues in glycans A and B are (α2 – 6)-linked to Gal [33].

Another deviation between the NMR spectra of the fibrinogen oligosaccharides and the meconium/sialidosis oligosaccharides stems from the presence of an additional GlcNAc-1 residue at the reducing end of the molecules. For this GlcNAc-1, the NAc signal is found at δ = 2.037 ppm, while the chemical shift of the NAc signal of GlcNAc-2 (δ = 2.083 ppm) points to (β1 – 4)-glycosidic linkage of this residue [29]. A similar reasoning holds for the anomeric signals. The chemical shift of H-1 of GlcNAc-1 in the α-anomer of oligosaccharides A and B (δ = 5.187 ppm) differs slightly from that for the reducing GlcNAc-2 in the meconium analogues (δ = 5.212 ppm), while the H-1 signal of GlcNAc-2 for oligosaccharides A and B is observed at a position (δ = 4.605 ppm) which is in accord with its (β1 – 4)-linkage to GlcNAc-1 [29]. These parameters for the reducing chitobiose core unit in these fibrinogen oligosaccharides are in good agreement with those found for similar asialyl-oligosaccharides isolated from urine of beagle dogs with GM_1-gangliosidosis [34].

Based on the aforementioned NMR results and those of carbohydrate (Table 1) and methylation (Table 2) analysis, the primary structure of the major fibrinogen oligosaccharide chains is established to be as depicted in Fig. 3. The given structure takes into account the loss of *N*-glycolyl groups from *N*-glycolylneuraminic acid during hydrazinolysis.

DISCUSSION

On the basis of the carbohydrate composition, methylation analysis and 360-MHz ^{1}H-NMR spoectroscopy, the primary structure of the two major glycans of bovine fibrinogen has been determined. The structures are identical to those of the two major glycans A-1 and A-2 of human fibrinogen, except for the presence of *N*-glycolyl nueraminic acid and the ratio of 2 for mono/disialylated glycans in human compared to 1 in bovine fibrinogen [11, 35]. The latter investigators applied 300-MHz ^{1}H-NMR spectroscopy of fibrinogen glycopeptides, in combination with exoglycosidase treatment, as the method of structural analysis. However, they assigned the difference in chemical shift ($\Delta\delta$ = 0.007 ppm) observed between H-1 of Man-4′ for their GP VII versus GP IV – VI, as a result of removal of NeuAc from the (α1 – 6)-branch by neuraminidase treatment. As can be concluded from [29], the chemical shift of H-1 of Man-4′ is influenced slightly but significantly by the presence of NeuAc in the (α1 – 3)-branch. This might be the explanation of the effect described by Townsend et al. [35]. The 300-MHz ^{1}H-NMR spectrum published in [35] suggests that these authors dealt mainly with the monosialylated glycopeptide, corresponding to oligosaccharide A in the present study.

Considering the amino acid sequences of the glycopeptides obtained from bovine fibrinogen [15, 36] it seems that the

glycans are located in peptide sequences of the β and γ chains analogous to those of human fibrinogen [37]. On the basis of previous results [15], it can be assumed that, like in human fibrinogen, the monosialylated glycans are preferentially located on the Asn-Lys-Thr sequence of the γ chain, while the disialylated ones are mainly located on the Val-Gly-Glu-Asn-Arg sequence of the β chain.

The monosialylated and disialylated biantennary structure of the *N*-acetyllactosamine type found in fibrinogens is widely distributed and has been found in numerous glycoproteins from various animal sources, playing very different roles (see the recent review of Montreuil [38]). Thus, the biological significance of these common structures remains to be investigated.

This work was supported in part by the *Université des Sciences et Techniques de Lille I*, by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (L.A. no. 217), by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO) and by the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF, grant UUKC-OC 79-13).

REFERENCES

1. Blomback, B. E. G. (1972) in *Glycoproteins* (Gottschalk, A., ed.) part B, pp. 1069–1079, Elsevier, Amsterdam.
2. Szara, S. & Bagdy, D. (1953) *Biochim. Biophys. Acta 111*, 313–318.
3. Chandrasekhar, N., Warren, L., Osbahr, A. S. & Laki, K. (1962) *Biochim. Biophys. Acta 63*, 337–339.
4. Mester, L., Szabados, L. & Collwitzer, R. (1966) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 262*, 1832–1834.
5. Tyler, H. M. (1966) *Nature (Lond.) 210*, 1045–1046.
6. Laki, K. & Mester, L. (1962) *Biochim. Biophys. Acta 57*, 152–153.
7. Montgomery, R. (1970) in *The Carbohydrates* (Pigman, W., Horton, D. & Herp, A., eds) vol. 2B, pp. 657–659, Academic Press, New York.
8. Nishibe, H. & Takahashi, N. (1981) *Biochim. Biophys. Acta 661*, 274–279.
9. Mester, L. & Szabados, L. (1968) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 266*, 34–36.
10. Mammen, E. F., Prasad, A. S., Banhart, M. I. & Au, C. C. (1969) *J. Lab. Clin. Invest. 48*, 235–249.
11. Mizuochi, T., Taniguchi, T., Asami, Y., Takamatsu, J., Okude, M., Iwanaga, S. & Kobata, A. (1982) *J. Biochem. (Tokyo) 92*, 283–293.
12. Anderson Bray, B. & Alexander, B. (1969) *Fed. Proc. 2*, 321.
13. Chandrasekhar, N. & Laki, K. (1964) *Biochim. Biophys. Acta 93*, 392–397.
14. Mester, L., Moczar, E. & Laki, K. (1963) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 256*, 307–309.
15. Mester, L., Moczar, E. & Szabados, L. (1967) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 265*, 877–880.
16. Strecker, G., Peers, M.-C., Michalski, J.-C., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Farriaux, J.-P., Maroteaux, P. & Durand, P. (1977) *Eur. J. Biochem. 75*, 391–403.
17. Schwartz, R. T., Schmidt, M. F. G., Anwer, W. & Klenk, H. D. (1977) *J. Virol. 23*, 217–226.
18. Murata, K., Ogura, T. & Okugawa, T. (1974) *Connect. Tissue Res. 2*, 101–109.
19. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem. 28*, 350–356.
20. Moczar, E. (1978) *J. Chromatogr. 146*, 337–343.
21. Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) *Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci. 221*, 209–218.
22. Reading, C. L., Penhoet, E. & Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem. 253*, 5600–5612.
23. Werner, J. & Odin, L. (1952) *Acta Soc. Med. Upsal. 57*, 230.
24. Bayard, B., Kerkaert, J. P., Roux, D. & Strecker, G. (1979) in *Protides of biological fluids* (Peeters, H., ed.) pp. 153–156, Pergamon Press, Oxford.
25. Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr. 69*, 291–304.
26. Schauer, R. (1978) *Methods Enzymol. 50*, 64–89.
27. Finne, J., Krusius, T. & Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res. 80*, 336–339.
28. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegenthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry 17*, 5206–5214.
29. Vliegenthart, J. F. G., Van Halbeek, H. & Dorland, L. (1980) in *IUPAC 27th International Congress of Pure and Applied Chemistry* (Varmavuori, A., ed.) pp. 253–262, Pergamon Press, Oxford.
30. Fukuda, M., Levery, S. B. & Hakomori, S. (1982) *J. Biol. Chem. 257*, 6856–6860.
31. Herlant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G. A. & Vliegenhart, J. F. G. (1981) *Eur. J. Biochem. 117*, 291–300.
32. Haverkamp, J., Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J. F. G., Pfeil, R. & Schauer, R. (1982) *Eur. J. Biochem. 122*, 305–311.
33. Vliegenthart, J. F. G., Dorland, L., Van Halbeek, H. & Haverkamp, J. (1982) *Cell Biol. Monogr. 10*, 127–172.
34. Warner, T. G. & O'Brien, J. S. (1981) in *Proceedings of the 6th International Symposium on Glycoconjugates* (Yamakawa, T., Osawa, T. & Handa, S., eds) pp. 10–11, Japan Scientific Societies, Tokyo.
35. Townsend, R. R., Hilliker, E., Li, Y. T., Laine, R. A., Bell, W. R. & Lee, Y. C. (1982) *J. Biol. Chem. 257*, 9704–9710.
36. Hashemeyer, R. H., Cynkin, M. A., Han, L. Ch. & Tridle, M. (1966) *Biochemistry 5*, 3443–3448.
37. Doolitlle, R. F., Bouma, H., Cotrell, B. A., Strong, D. & Watt, K. W. K. (1979) in *Chemistry and physiology of human plasma proteins* (Bing, H. D., ed.) pp. 77–85, Pergamon Press, New York.
38. Montreuil, J. (1982) *Comprehensive biochemistry* (Neuberger, A. & Van Deenen, L. M., eds.) vol. 19B-II, pp. 1–188, Elsevier, Amsterdam.

ETUDE DES GLYCANNES DU COMPLEXE FACTEUR VIII/FACTEUR DE VON WILLEBRAND

I - INTRODUCTION.

Le complexe protéique plasmatique appelé F-VIII/vWf porte à la fois les activités biologiques du facteur VIII (F-VIII) et du facteur de von Willebrand (FvW) intervenant respectivement dans la coagulation sanguine et dans l'hémostase primaire.

Le F-VIII, contrairement à la majeure partie des facteurs de coagulation, n'est pas une sérine protéase, mais un cofacteur enzymatique : après avoir été activé en F-VIIIa par des traces de prothrombine, il se lie au facteur IX activé, aux phospholipides plaquettaires et aux ions Ca^{++} (HOUGIE et al. -305-) ce qui conduit à l'activation du facteur X, ce dernier étant directement impliqué dans la conversion de la prothrombine en thrombine. Le déficit total ou partiel en F-VIII provoque un syndrome hémorragique : l'hémophilie A.

Le facteur Willebrand interviendrait dans l'adhésion entre les plaquettes et le sous-endothélium vasculaire (TSCHOPP et al. -306-, WEISS et al.-307-). CAEN et al. (-308-) ont montré que le facteur Willebrand s'absorbe sur le collagène de type III mais les preuves de l'adhésion de ce facteur sur les plaquettes natives sont moins nettes (KAO et al. -309-, MORISATO et GRALNICK -310-).

Par contre, en présence de ristocétine, le facteur Willebrand adhère aux plaquettes et peut même les agréger dans certaines conditions. Ces propriétés d'adhésion et d' agrégation ont été utilisées par KAO et al. (-311-) et SARJI et al. (-312-) pour mettre au point des dosages de l'activité cofacteur de la ristocétine associée au taux de facteur Willebrand. Le déficit total ou partiel du facteur Willebrand ainsi que des modifications de la structure quaternaire du complexe protéique conduisent à des désordres hémorragiques regroupés sous le terme de maladie de von Willebrand.

On ne possède que peu d'éléments sur la structure du F-VIII/vWf et même la masse moléculaire de ce complexe reste encore controversée. Elle varie de 10^6 à $20x10^6$ daltons selon différents auteurs, pour les molécules purifiées (COUNTS et al. -313-, MAZURIER et al. -314-, HERSHGOLD et al. -315-), tandis que certaines équipes mettent en doute l'existence de ce complexe de haut poids moléculaire in vivo (ROCK et al. -316-, SEGHATCHIAN et al. -317-). Il ressort néanmoins de la majorité des travaux que le F-VIII/vWf résulte de l'association non covalente du facteur VIII de faible masse moléculaire et du facteur de Willebrand de masse moléculaire importante et de structure multimérique (FASS et al. -318-). Il faut noter que le F-VIII d'une masse moléculaire de 250.000 daltons (MAZURIER et al. -319-) représente 1 p. 100 du complexe F-VIII/vWf tandis que le FvW est composé de sous unités de 230.000 daltons et représente 99 p. 100 du complexe (BENNETT et al. -320-).

Le F-VIII/vWf est un complexe de nature glycoprotéinique (HERSHGOLD et al. -321-, KASS et al. -322-) et la composition centésimale en sucres totaux, extrêmement variable selon les auteurs (de 6 p. 100 selon LEGAZ et al. -323- à 40 p.100 selon PAULSSEN et al. -324-), est actuellement estimée à 15 p. 100 (SODETZ et al. -325-, MAZURIER et al. -326-, GRALNICK et al. -327-). Les monosaccharides représentés sont la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine, le galactose, le mannose, le fucose et l'acide N-acétylneuraminique (SODETZ et al. -328-, MAZURIER et al. -329-). Compte tenu de l'importance du FvW dans le F-VIII/vWf (99 p. 100) et de la composition centésimale en sucres du complexe (15 p.100), le FvW est de nature glycoprotéinique. SHAPIRO et al. (-330-) ont montré d'ailleurs que les sous-unités du FvW réagissaient avec le réactif de Schiff après oxydation périodique. Les difficultés rencontrées lors de la préparation du F-VIII associées à une faible teneur plasmatique (50 µg/litre de plasma) n'ont pas permis de préciser avec certitude sa nature glycoprotéinique. Toutefois, TUDDENHAM et al. (-331-) ont

montré que le F-VIII possède une affinité pour la Concanavaline A et ROCK et al. (-332-) estimèrent à 10 p. 100 sa teneur en monosaccharides.

C'est au sujet du facteur Willebrand que nous avons le plus de renseignements sur le rôle potentiel des glycannes dans son activité biologique. En comparant la composition glucidique du F-VIII/vWf isolé de plasmas normaux et de plasmas de patients atteints de la maladie de Willebrand, GRALNICK et al. (-333-) et DE MARCO et SHAPIRO (-334-) notèrent une nette diminution de l'acide sialique du F-VIII/vWf pathologique. Mais le rôle de l'acide sialique dans la fixation du F-VIII/vWf aux plaquettes et dans l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine reste très controversé. En dehors du fait que la désialylation du F-VIII/vWf diminue considérablement sa demi-vie plasmatique (SODETZ et al. -335-), l'action de la neuraminidase induirait une diminution de l'activité du FvW ou ne l'affecterait pas , selon les auteurs, (KAO et al. -336-, MORISATO et GRALNICK -337-).

Le groupe de GRALNICK (GRALNICK -338- ; MORISATO et GRALNICK -339-) a également montré que les résidus de galactose situés en position terminale non réductrice des glycannes, jouaient un rôle prépondérant dans l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine, puisque la modification ou l'excision de ces monosaccharides par la galactose oxydase ou la ß-galactosidase induisaient une trés nette diminution de ces propriétés. Enfin, lors de travaux récents, GOUDEMAND et al. (-340-) ont pu montrer que la dégalactosylation du F-VIII/vWf induisait une perte de la fixation de ce complexe aux plaquettes, en présence de ristocétine, tandis que sa fixation en présence de thrombine n'était pas affectée. Par ailleurs, ces auteurs ont également montré que la présence du galactose se révèlait être indispensable au maintien de la structure multimérique du F-VIII/vWf.

Mais aucun de ces travaux n'a pu mettre en évidence des relations structures glycanniques -activités biologiques plus étroites puisqu'il n'existait pas de données sur la structure des glycannes du F-VIII/vWf.

II - MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DES GLYCANNES DU F-VIII/vWf

Bénéficiant d'une étroite collaboration avec l'équipe du Professeur GOUDEMAND, Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille, spécialisée dans l'étude du F-VIII/vWf et des relations existantes entre la copule glycannique et les activités biologiques de ce facteur, nous avons appliqué les différentes méthodologies de détermination des structures primaires des glycannes que nous avions développées au laboratoire, au complexe F-VIII/vWf. Le problème majeur de cette étude résidait dans la faible quantité de matériel glucidique disponible ce qui nécessitait une miniaturisation des méthodes. En effet, le F-VIII/vWf comporte bien 15 % de sucres, mais :

1 - le plasma ne contient que 5 à 10 mg de ce complexe par litre.
2 - Sa purification nécessite de nombreuses étapes coûteuses en raison des faibles rendements obtenus (voir Figure 11; p. 98).
3 - Ce complexe renferme à la fois de la N-acétylglucosamine et de la N-acétylgalactosamine suggérant la présence de glycannes de types O- et N-glycosidique compliquant les études structurales.

La publication suivante fait suite aux travaux de MAZURIER et al. (-341-) qui ont précisé la composition en monosaccharides du F-VIII/vWf. Grâce à des expériences de ß-élimination en milieu réducteur et d'hydrazinolyse, menées en étroite collaboration avec B. SAMOR du C.R.T.S. de Lille, nous avons pu montrer que :

Concentrés thérapeutiques
cryoprécipités, lyophilisés,
reconstitués en eau

↓

Fibrinoprécipitation:
précipitation par le glycocolle
(concentration finale: 12%)

↓

Centrifugation (5000g, 20°C, 30 min)

↓

Congélation du surnageant (-80°C)

↓

Décongélation lente (36h à 4°C)

↓

Centrifugation (30.000g, 4°C, 30min)

↓

Précipité (fraction S-VIII) dissous
dans un tampon imidazole 0,02 M/NaCl 0,14 M, pH 7,0

↓

Chromatographie de tamisage moléculaire sur
une colonne de Biogel A-50 M (50-100 mesh)

↓

Fractions recueillies à l'exclusion (fraction V_0-VIII)
contenant le F-VIII/vWf

BU LILLE

Figure 11 - Schéma de purification du F-VIII/vWf selon MAZURIER et al. (-342-).

1 - Les deux types de glycannes, O- et N- glycosidiques, étaient présents sur le F-VIII/vWf, puisque toute la N-acétylgalactosamine a été réduite après ß-élimination en milieu réducteur et qu'après hydrazinolyse, les glycannes résiduels ne renfermaient plus de N-acétylgalactosamine.

2 - D'un point de vue méthodologique, il faut noter que nous n'avons pas mis en évidence de N-acétylglucosaminitol après ß-élimination en milieu réducteur, ce qui tend à prouver que dans ce cas, très peu ou pas de glycannes de type N-glycosidique ont été libérés. D'autre part, nous ne retrouvons pas de glycannes de type O-glycosidique après hydrazinolyse, ce qui est en accord avec les travaux de KROTKIEWSKI et LISOWSKA (-343-).

BU LILLE

3 - Le F-VIII/vWf présente une très grande hétérogénéité glycannique. Nous avons pu séparer par chromatographie sur couche mince trois glycannes de type N-glycosidique et dix glycannes de type O-glycosidique représentant respectivement 70 et 30 % des sucres totaux, ce qui, sur la base d'une masse moléculaire de 200.000 daltons pour la forme protomérique du F-VIII, représente 8 à 9 chaînes N- et O-glycosidiques par sous-unités.

THROMBOSIS RESEARCH 25; 81-89, 1982
0049-3848/82/010081-09$03.00/0 Printed in the USA.
Copyright (c) 1982 Pergamon Press Ltd. All rights reserved.

PRELIMINARY RESULTS ON THE CARBOHYDRATE MOIETY OF FACTOR VIII/VON WILLEBRAND FACTOR (FVIII/vWf)

B. SAMOR, C. MAZURIER and M. GOUDEMAND.
Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21, Rue C. Guérin, 59012 LILLE, FRANCE

P. DEBEIRE, B. FOURNET and J. MONTREUIL.
Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ Cédex, FRANCE

(Received 27.4.1981; in revised form 25.11.1981.
Accepted by Editor D. Meyer)

ABSTRACT

Human FVIII/vWf, purified 9 000 fold, was prepared from therapeutic concentrates by gel filtration and by immuno-affinity chromatography on insolubilized immunoglobulins isolated from a rabbit immunized with the plasma of a patient devoid of FVIII R:Ag. These preparations which contain coagulant activity and agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin are immunologically pure. The carbohydrate moiety of this highly purified FVIII/vWf was submitted to analysis by gas liquid chromatography and thin layer chromatography before and after hydrazinolysis and alkaline-borohydride treatment. The total carbohydrate content is 14.4 p. cent (w/w). Man and GalNAc residues were identified, this result indicating the coexistence of N- and O-glycosidically linked glycans (70 and 30 p. cent respectively). After hydrazinolysis it was demonstrated that the N-glycosidically linked glycans do not contain GalNAc residues. One major glycan belonging to the N-acetyllactosaminic type with a bi-antennary structure has been characterized by thin layer chromatography. The alkaline-borohydride treatment procedure reduced all the FVIII/vWf GalNAc to GalNAc-ol residues, demonstrating that they are all involved in the linkage of the O-glycans with the peptide chain and consequently they cannot be in oligosaccharidic sequences inducing A-blood group activity. Furthermore, at least 10 O-glycosidically linked glycans were identified by thin layer chromatography. Thus, the high degree of heterogeneity of the FVIII/vWf carbohydrate moiety requires further structural studies in order to precise which class of glycans is involved in the biological activity of FVIII/vWf.

Key words : Factor VIII/vWf - Carbohydrates - Glycans -

INTRODUCTION

Human factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/vWf) is a complex containing a coagulant activity (FVIII:C) and an activity required for normal platelet hemostatic function which is carried by a factor VIII-related antigen (FVIII R:Ag) and measured by its ability to agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin (FVIII R:RCo). Recent studies suggest that the carbohydrate moiety of FVIII/vWf is important for the binding of FVIII/vWf to platelets in presence of ristocetin and for the in vivo survival of the protein (1-6). Moreover, blood group A, B and H activities have been recently characterized on human FVIII/vWf (7). However, the carbohydrate composition of FVIII/vWf is not yet precisely known and the results published (8-10) have been obtained from preparations with different degrees of purity.

The aim of this paper was to establish more precisely the monosaccharide composition of a preparation of highly purified FVIII/vWf and to determine the nature of its carbohydrate chains.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and purification of factor VIII/vWf. Factor VIII/vWf was purified from therapeutic concentrates according to a procedure previously described (11) : after gel filtration of factor VIII concentrates (1 500 FVIII:C units) on a Biogel A-50M column (2.6 x 80 cm), the void volume fractions were further purified by immuno-affinity chromatography on a column of immunoglobulins-Sepharose (2.6 x 30 cm). The immunoglobulins were obtained from the serum of a rabbit immunized with the plasma of a patient with severe von Willebrand's disease, devoid of Factor VIII/vWf (VIII R:Ag < 0.003 U/ml). The fractions not bound to the insolubilized immunoglobulins, called L-VIII, were submitted to immunological analysis and after delipidation according to Folch et al.(12) to chemical analysis.

Carbohydrate determinations. The centesimal carbohydrate composition, identification and molar ratio of monosaccharides of the intact glycoprotein and of its products of hydrazinolysis and β-elimination were determined by gas-liquid chromatography (g.l.c.) after methanolysis and trifluoroacetylation using the technique described by Zanetta et al. (13).

Treatment with alkaline-borohydride was performed on delipidated L-VIII preparations as described by Aminoff et al. (14) with some minor modifications. The reaction was stopped by placing the solution in an ice bath and adding Dowex 50 x 8 (25-50 mesh, H+ form) until pH 4.5 was reached. The mixture of reduced oligosaccharides and glycopeptides with N-linked glycans, which are stable in the conditions of β-elimination, was desalted by gel filtration on a Biogel P-2 column.

Hydrazinolysis. A lyophilized and delipidated L-VIII preparation was hydrazinolysed according to Bayard et al. (15) : the sample (30 mg) was dried in vacuum over P_2O_5 and then heated in a glass sealed tube with 300 µl anhydrous hydrazine for 20 h at 105° C. The excess of hydrazine was evaporated under nitrogen. The evaporation was repeated twice after addition of a few drops of toluene. The residual hydrazine was eliminated in vacuum over H_2SO_4. This procedure specifically liberates N-deacetylated glycans N-glycosidically linked and destroys O-linked glycans (16). The glycans were further desalted as above and re-N-acetylated according to Reading et al. (17).

Thin layer chromatography (t.l.c.). Oligosaccharides were chromatographed overnight on silica thin-layer plates (HPTLC Silicagel 60) with solvent : pyridine/ethanol/acetic acid/n-butanol/water (10 : 100 : 3 : 10 : 30 by volume. In this solvent system, the glycopeptides do not migrate (18).

Other methods. FVIII coagulant activity was measured by a one-stage method (19), FVIII R:Ag by an immunoenzymatic assay (20) and FVIII R:RCo by a micro-titration technique (21). The protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (22).

Standards (purified N- and O- glycosidically linked glycans). The mixture of N-glycosidically linked glycans A (disialylated) and B (monosialylated) was prepared from human serum transferrin by hydrazinolysis and their structures were determined (23) as follows : Glycan A : 1 NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 6 (NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 3) Man β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 4 GlcNAc ; Glycan B : NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α1 — 6 or 3 (Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 3 or 6) Man β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 4 GlcNAc.

RESULTS

L-VIII fractions, with a mean of 129 U FVIII R:Ag/mg, were purified approximatively 9 000 fold from human plasma with an overall yield of about 7 p. cent. Their specific FVIII:C and FVIII R:RCo activities were 29.3 and 34.5 U/mg respectively. These preparations gave no precipitation line against different antisera (anti-fibrinogen, - fibronectin, - immunoglobulins, - β - lipoproteins) and furthermore they induced in rabbits monospecific antibodies against FVIII/vWf.

The lipid content (21.5 ± 1.5 p. cent) was estimated on four lyophilized L-VIII preparations by weighing the fractions extracted by the chloroform-methanol mixture. Although this amount was reproducible from one experiment to the other, we cannot yet assert that these lipids are not adsorbed on the glycoprotein. These lipidic fractions were submitted to analysis by g.l.c. and as no sugar could be detected, the results below are related to the whole carbohydrate moiety of the glycoprotein.

The carbohydrate centesimal composition of FVIII/vWf (Table I) was determined on four lyophilized and delipidated L-VIII preparations. The application of g.l.c. to the study of the whole FVIII/vWf glycoprotein indicates a large amount of sugars (mean 14.4 p. cent) and NeuAc (mean 3.9 p. cent).

TABLE I

Centesimal Composition of Delipidated FVIII/vWf.

L-VIII preparations	1	2	3	4	Mean
Total carbohydrate content	12	17.2	14.5	13.8	14.4
Neutral monosaccharides	5.8	7	6.7	5.75	6.32
N-acetylhexosamines	3.6	5.3	3.85	3.87	4.16
N-acetylneuraminic acid	2.6	4.9	3.9	4.2	3.9

Identification and molar ratios determination of monosaccharides were performed as described in "Materials and Methods" and the results are summarized in Table II. The monosaccharides were identified as mannose (Man), galactose (Gal), fucose (Fuc), N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) and molar ratios were calculated on the basis of 3 Man residues which make up the inner-core of N-glycosidically linked glycans containing GlcNAc residues (24).

TABLE II

Monosaccharide Molar Ratios of FVIII/vWf Glycans

L-VIII preparations	1	2	3	4	Mean
Mannose	3	3	3	3	3
Galactose	4.1	3.8	4	3.4	3.83
Fucose	1.2	1.13	1.3	1.06	1.17
N-acetylglucosamine	4.4	4.69	4.2	4.56	4.46
N-acetylgalactosamine	1.14	1.12	0.92	0.84	1
N-acetylneuraminic acid	2.4	3.4	3	3.43	3.06

The simultaneous presence of Man, which is rarely identified in O-glycosidically linked glycans, and of GalNAc, a common marker of many oligosaccharides O-glycosidically linked to peptide chains (25), indicates that FVIII/vWf probably contains both N- and O-glycans. It is in order to verify this hypothesis that the purified FVIII/vWf preparations were further subjected to alkaline-borohydride treatment and hydrazinolysis (Table III).

TABLE III

Comparison between Monosaccharide Molar Ratios of Native FVIII/vWf (intact glycoprotein with both N- and O-glycans) (A), FVIII/vWf submitted to alkaline-borohydride treatment (reduced O-glycans and N-glycopeptides) (B), and FVIII/vWf hydrazinolysate (N-glycans) (C).

	A	B	C
Mannose	3	3	3
Galactose	3.83	3.8	2.4
Fucose	1.17	1.19	1.4
N-acetylglucosamine	4.46	4.2	4.2
N-acetylgalactosamine	1	0	0
N-acetylgalactosaminitol	0	0.99	0
N-acetylneuraminic acid	3.06	3.6	1.3

Table III-B shows the monosaccharide molar ratio of the products of β-elimination of FVIII/vWf. This ratio is identical to those obtained from the intact FVIII/vWf molecule (Table III-A). In fact, during the alkaline-borohydride treatment, the N-glycans, stable in reductive conditions, remained bound to peptidic chains, whereas the O-glycosidically linked glycans were released and reduced. The GalNAc residues were quantitatively reduced into N-acetylgalactosaminitol (GalNAc-ol) residues, so we can affirm that they are all involved in the linkage to serine or threonine residues and that they do not belong to N-glycosidically linked glycans. Furthermore, the t.l.c. of the products of β-elimination indicates a high degree of heterogeneity of the O-glycans (Fig. 1) : at least 10 migrating reduced oligosaccharides are characterized while the N-glycopeptides do not migrate in the solvent system used.

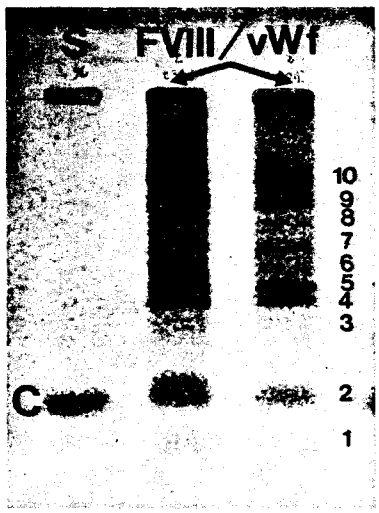


FIG. 1

Thin layer chromatography of FVIII/vWf O-glycosidically linked glycans released by alkaline-borohydride treatment (FVIII/vWf) and of the standard (S) : glycan C.

The monosaccharide molar ratio of FVIII/vWf submitted to hydrazinolysis is reported in Table III-C. As expected the Man, Fuc, GlcNAc molar ratio was similar to those of intact FVIII/vWf and no GalNAc residues could be detected. This result confirms that FVIII/vWf N-glycans do not contain GalNAc residues. This monosaccharide molar ratio of FVIII/vWf hydrazinolysate (Table III-C) is in agreement with the existence of a glycan of the N-acetyllactosaminic type with a monosialylated bi-antennary structure and one additionnal Fuc residue (theoritical monosaccharide molar ratio : Man : 3, Gal : 2, Fuc : 1, GlcNAc : 4, NeuAc : 1) (24). The t.l.c. of FVIII/vWf hydrazinolysate also gives evidence for a major component which migrates like the standard B (Fig.2).

On the basis of the FVIII/vWf centesimal composition (Table I), the monosaccharide molar ratios (Table II) and the molecular weight of the major N-glycosidically linked glycan characterized after hydrazinolysis (Table III-C) we can estimate that the N-glycans represent about 70 p. cent of the carbohydrate moiety of FVIII/vWf.

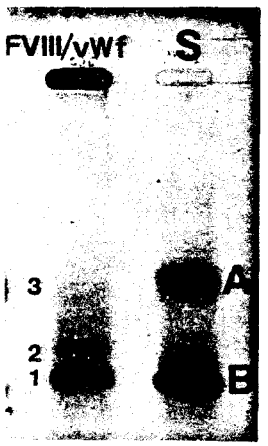


FIG. 2

Thin layer chromatography of FVIII/vWf N-glycosidically linked glycans released by hydrazinolysis (FVIII/vWf) and of the standards (S) : glycans A and B.

The results of hydrazinolysis (Table III-C) showing the presence of 3 Man residues in the major FVIII/vWf N-glycan, those of β-elimination demonstrating the existence of only 1 GalNAc-ol residue per reduced O-glycan (Table III-B) and the molar ratio Man : GalNAc (3:1) obtained with the intact glycoprotein (Table III-A) allow the assumption that O- and N-glycans of FVIII/vWf are in an equimolar ratio.

DISCUSSION

The method used to purify human FVIII/vWf in non-denaturing conditions provided sufficient amounts for chemical analysis. This preparation induced, like the Factor VIII obtained by heparin-Sepharose chromatography (26), monospecific antibodies in rabbits and has the advantage of keeping in part its biological activities (FVIII R:RCo and FVIII:C).

The lipid percentage of this preparation was higher than those previously published (8,27). This amount was reproducible from one preparation to the other and may be due to an adsorbtion of lipids onto FVIII/vWf molecules consecutive to our starting material and/or our purification method. However, since this lipidic fraction, which was easily eliminated from FVIII/vWf glycoprotein, contains no detectable sugar, our analysis is related to the whole carbohydrate moiety of FVIII/vWf.

This report indicates that FVIII/vWf contains a total carbohydrate content (14.4 p. cent) higher than those of most previous studies (8 - 10) but in agreement with the recent report of Sodetz et al. (7). Moreover we confirm the respective ratios of neutral sugars, N-acetylhexosamines, N-acetylneuraminic acid and N-acetylgalactosamine obtained by the latter authors (7).

Previous publications have noticed the simultaneous presence of Man and GalNAc residues in FVIII/vWf which suggests the presence of O- and N-glycosidically linked glycans (5, 7, 9, 28). Our results clearly demonstrate the co-existence of 30 p. cent of O- and 70 p. cent of N-glycosidically linked glycans. Furthermore, by t.l.c., we have given evidence of the high degree of heterogeneity of these glycans : at least 10 O-linked oligosaccharides and 3 N-linked glycans are separated.

The molar ratio of the products of hydrazinolysis indicates the

destruction of O-linked glycans and suggests the existence of a major N-linked glycan of the N-acetyllactosaminic type probably having a monosialylated bi-antennary structure. These findings are confirmed by t.l.c. analysis.

At last, some data are in contradiction with the findings of Sodetz et al. (7) who reported that FVIII/vWf oligosaccharides inducing blood group A activity may belong to glycans with alkaline-stable linkage. First, after alkaline-borohydride treatment, all the GalNAc residues are reduced so they are all involved in the linkage of the O-linked glycans with the protein and consequently cannot support the A-blood group activity which requires non-reducing terminal GalNAc residues. Secondly, as it was demonstrated by the analysis of the products of FVIII/vWf hydrazinolysis, the N-glycosidically linked glycans, with alkaline-stable linkage, do not contain any GalNAc residues. In conclusion, none of these glycans possesses oligosaccharidic sequences able to induce A-blood group activity. These results and others experiments (29) suggest that the blood group activity of FVIII/vWf molecules is not related to their own glycans but is probably due to a minor contamination by a glycolipidic or glycoproteinic blood component.

In account of the high degree of heterogeneity of the carbohydrate moiety of FVIII/vWf, further structural studies will require fractionation followed by methylation, enzymatic analysis, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry studies of glycans. The results may be fruitful to ascertain the type of oligosaccharides implicated in the biological activities of this complex molecule.

AKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mr Y. LEROY, C.N.R.S. technician, for his skilful technical assistance.
This study was supported by a grant of DGRST 81 L 0433.

REFERENCES

1. FUKUI, H. Some biological aspects of von Willebrand factor. Proc. XIth Cong. W.F.H., 71-79, 1976

2. GRALNICK, H.R. Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. J. Clin. Invest., 62, 496-499, 1978

3. MORISATO, D.K. and GRALNICK H.R. Selective binding of factor VIII/vWf to human platelets. Blood, 55, 9-15, 1980

4. SODETZ, J.M., PIZZO, S.V. and McKEE, P.A. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. J. Biol. Chem., 252, 5538-5546, 1977

5. SODETZ, J.M., PAULSON, J.C., PIZZO, S.V. and McKEE, P.A. Carbohydrate on human factor VIII/von Willebrand factor. Impairment of function by removal of specific galactose residues. J. Biol. Chem., 253, 7202-7206, 1978

6. KAO, K.J., PIZZO, S.V., McKEE, P.A. Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. J. Biol. Chem., 255, 10134-10139, 1980

7. SODETZ, J.M., PAULSON, J.C. and McKEE, P.A. Carbohydrate composition and identification of blood group A, B and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 254, 10754-10760, 1979

8. HERSHGOLD, E.J., DAVINSON, A.M. and JANSZEN, M.E. Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Lab. Clin. Med., 77, 185-205, 1971

9. MARCHESI, S.L., SHULMAN, N.R. and GRALNICK, H.R. Studies on the purification and characterization of human factor VIII. J. Clin. Invest., 51, 2151-2161, 1972

10. LEGAZ, M.E., SCHMER, G., COUNTS, R.B. and DAVIE, E.W. Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Biol. Chem., 248, 3946-3955, 1973

11. MAZURIER, C., PARQUET-GERNEZ, A., SAMOR, B., GOUDEMAND, M. and MONTREUIL, J. Etude de l'antigène lié au facteur VIII (FVIII R:Ag). Purification par chromatographie d'immuno-affinité. C.R. Acad. Sc. Paris, 288, 1431-1434, 1979

12. FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509, 1957

13. ZANETTA, J.P., BREKENRIDGE, W.C. and VINCENDON, G. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. J. Chromatogr., 69, 291-304, 1972

14. AMINOFF, D., GATHMANN, W.D., McLEAN, C.M., YADOMAE, T. Quantitation of oligosaccharides released by the β-elimination reaction. Anal. Biochem., 101, 44-53, 1980

15. BAYARD, B. and MONTREUIL, J. Actes du Colloque International N° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Editions du C.N.R.S., Paris, 209-218, 1974

16. KROTKIEWSKI, H. and LISOWSKA, E. Alkali-stable oligosaccharides isolated by hydrazinolysis of M and N blood group glycoproteins. Arch. Immunol. Ther. Exp., 26, 139-144, 1978

17 READING, C.L., PENHOET, E. and BALLOU, C. Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. J. Biol. Chem., 253, 5600-5612, 1978

18. BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., ROUX, D. and STRECKER, G. Hydrazinolysis of rat α-foetoprotein variants. In : Protides of Biological Fluids. H. Peeters (Ed.) Pergamon Press, 1979, pp. 153-156

19. SOULIER, J.P. and LARRIEU, M.J. Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des fractions antihémophiliques A et B. Sang, 205-215, 1953

20. MAZURIER, C., PARQUET-GERNEZ, A. and GOUDEMAND, M. Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la maladie de Willebrand. Path. Biol., 25 suppl., 18-24, 1977

21. SULTAN, Y. and ROSSI, J. Méthode de mesure de l'activité Willebrand sur plaque de microtitration. Nouv. Presse Med., 6, 44-46, 1977

22. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951

23. SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. and MONTREUIL, J. Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. FEBS Lett., 50, 296-299, 1975

24. MONTREUIL, J., Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implication. Pure and Appl. Chem., 42, 431-477, 1975

25. MONTREUIL, J., Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157-223, 1980

26. MADARA, F., BELL, W.R. and CASTALDI, P.A. Isolation and insolubilisation of human factor VIII by affinity chromatography. Haemostasis, 7, 321-329,

27. OLSON, J.D., BROCKWAY, W.J., FASS, D.N., BOWIE, E.J.W., MANN, K.G. Purification of porcine and human ristocetin-Willebrand factor. J. Lab. Clin. Med., 89, 1278-1294, 1977

28. MAZURIER, C., SAMOR, B., PARQUET-GERNEZ, A., FOURNET, B., GOUDEMAND, M., and MONTREUIL, J. Chemical composition of factor VIII. In : Protides of Biological Fluids. H. Peeters (Ed.) Pergamon Press, 1980, pp. 229-302

29. MAZURIER, C., SAMOR, B., MANNESSIER, L., PARQUET-GERNEZ, A. and GOUDEMAND M. Blood group A and B activity associated with Factor VIII/von Willebrand factor. Blood Transf. Immunohematol., 24, 289-297, 1981

III -DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DU GLYCANNE MAJEUR DE TYPE N-GLYCOSIDIQUE DU F-VIII/vWf

Dans la publication précédente, nous avions mis en évidence par chromatographie sur couche mince un glycanne majeur migrant comme un oligosaccharide témoin biantenné et monosialylé. Nous nous sommes attaché à le purifier afin de préciser sa structure primaire.

Après hydrazinolyse d'une préparation de F-VIII/vWf délipidé (10 mg), les glycannes ont été N-réacétylés en partie avec de l'anhydride acétique (^{14}C), afin de pouvoir facilement repérer les faibles quantités de glycannes lors des différents fractionnements. 5 familles de glycannes furent préparées par électrophorèse sur papier à haut voltage, analysées par chromatographie sur couche mince et visualisées par autoradiographie (voir Figure 12; p.117). La fraction 3, qui se révèla homogène en chromatographie sur couche mince, représentait 60 p. 100 des glycannes de type N-glycosidique et correspondait au glycanne majeur du F-VIII/vWf. Disposant de 200 µg de ce glycanne, nous avons pu établir sa structure primaire sur la base des résulats issus des expériences de méthylation et des analyses en R.M.N. du proton à 500 MHz.

Volume 151, number 1 FEBS LETTERS January 1983

Structure determination of the major asparagine-linked sugar chain of human factor VIII–von Willebrand factor

P. Debeire, J. Montreuil, B. Samor*, C. Mazurier*, M. Goudemand*, H. Van Halbeek+ and J.F.G. Vliegenthart+

*Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS no. 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, *Centre Régional de Transfusion Sanguine, Laboratoire d'Hémostase, 21, rue Camille Guérin, 59012 Lille Cédex, France* and *+Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522-AD Utrecht, The Netherlands*

Received 23 November 1982

N-glycosidically-linked glycans released by hydrazinolysis of human factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/vWf) were separated by high-voltage electrophoresis. Five fractions were obtained, one of them representing 60% of the total amount of the *N*-glycosidically-linked glycans of FVIII/vWf. On the basis of the carbohydrate composition, methylation analysis and 500 MHz ^{1}H-NMR spectroscopy, we describe the primary structure of this major glycan which is of the monosialylated and monofucosylated biantennary *N*-acetyllactosaminic type.

Factor VIII *von Willebrand factor* N-*Glycosididic glycan*

1. INTRODUCTION

Human factor VIII–von Willebrand factor (F VIII–vWf) is a complex containing a coagulant activity (F VIII-C) and an activity required for normal platelet hemostatic function which is carried by a factor VIII-related antigen (F VIII R-Ag) and measured by its ability to agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin (F VIII R-RCo). Recent studies suggest that the carbohydrate moiety of F VIII–vWf is important for the binding of the latter to platelets in the presence of ristocetin and for the in vivo survival of the protein [1–7]. We have demonstrated that the carbohydrate moiety of F VIII–vWf contains *N*- and *O*-glycosidically-linked glycans. After hydrazinolysis, a major glycan of the *N*-acetyllactosaminic type has been characterized by thin-layer chromatography [8]. Here, on the basis of the carbohydrate composition and the results of methylation analysis, mass spectrometry and 500 MHz ^{1}H-NMR spectroscopy, we describe the primary structure of this major glycan.

2. MATERIALS AND METHODS

Human F VIII–vWf was purified from therapeutic concentrates as in [9]. A lyophilized and delipidated F VIII preparation (10 mg) was hydrazinolyzed as in [10] and the liberated, *N*-deacetylated glycans were *N*-reacetylated, first with [^{14}C]acetic anhydride (CEA, 5–10 mCi/mM) and then with non-labelled acetic anhydride [11]. The liberated glycans were separated by high-voltage electrophoresis on Whatman 3 MM paper in the buffer: pyridine–acetic acid–water (18:6:2320, by vol.; pH 5.4) [12], at 75 V/cm. The radioactive spots were cut and eluted with water. Following standards were used: desialylated (A), monosialylated (B) and disialylated (C) glycans of the *N*-acetyllactosaminic type prepared from human serum transferrin [13] by hydrazinolysis.

Molar ratios of neutral monosaccharides, *N*-acetylhexosamines and *N*-acetylneuraminic acid were determined after methanolysis and trifluoroacetylation by gas–liquid chromatography [14]. Permethylation of oligosaccharides (200 μg) was

Published by Elsevier Biomedical Press
00145793/83/0000—0000/$3.00 © Federation of European Biochemical Societies

carried out as in [15]. Methylglycosides resulting from methanolysis of permethylated oligosaccharides were identified by gas–liquid chromatography and mass spectrometry as in [16].

For NMR analysis the oligosaccharide fraction 3 (200 μg) was repeatedly exchanged in D_2O (99.96 atom% D, Aldrich), after adjustment of the pH of the solution to 7. The 500 MHz ^{1}H-NMR spectrum was recorded on a Bruker WM-500 spectrometer F (SON-facility, Nijmegen University), operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 27°C (for further details, see [17]). Chemical shifts are given relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate (indirectly to acetone in D_2O: δ = 2.225 ppm).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Separation of* N-*glycosidically-linked glycans by high-voltage electrophoresis*

By high-voltage electrophoresis of the *N*-reacetylated [^{14}C]glycans released from F VIII–vWf by hydrazinolysis, 5 fractions were obtained (fig.1), which are constituted of neutral (fraction 1), monosialylated (fractions 2 and 3) and disialylated (fractions 4 and 5) oligosaccharides. These fractions appear to be heterogeneous by paper electrophoresis and/or by thin-layer chromatography, except the major fraction 3.

3.2. *Carbohydrate composition of the* N-*glycosidic carbohydrate chains*

The molar carbohydrate composition of the 5 fractions is given in table 1. The sugar moiety of fraction 3 represents 60% of the total amount of the *N*-glycosidically-linked oligosaccharides of F VIII–vWf. The structural investigations were carried out on this major and homogeneous fraction.

3.3. *Primary structure determination*

The primary structure of the major *N*-glycosidic glycan of F VIII–vWf was established by

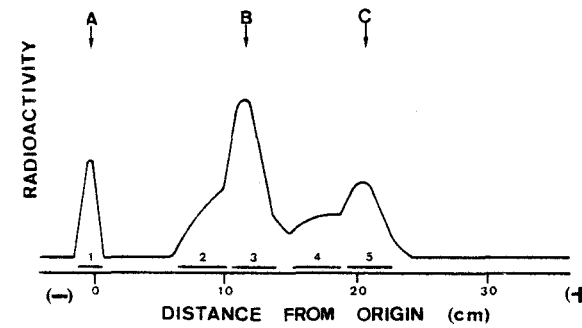


Fig.1. Radioelectropherogram of the oligosaccharides released from F VIII–vWf by hydrazinolysis (for details of the experimental procedure, see section 2).

Table 1

Molar carbohydrate composition[a] of the oligosaccharides released from F VIII–vWf by hydrazinolysis and separated by high-voltage electrophoresis

Monosaccharide	Combined oligosaccharides	Fraction				
		1	2	3	4	5
Man	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Gal	2.6	3.0	3.4	2.0	3.4	3.0
Fuc	1.6	2.0	2.0	1.2	traces	1.2
GlcNAc	4.3	4.0	4.8	4.2	4.0	4.8
GalNAc	–	–	–	–	–	–
NeuAc	1.2	–	0.85	1.0	1.6	2.0
Sugar content for each fraction (%)	100	10	8	60	6	16

[a] Calculated on the basis of 3 mannose residues/molecule

500 MHz ^{1}H-NMR spectroscopy, in conjunction with permethylation analysis. The results of the latter are compiled in table 2.

The 500 MHz ^{1}H-NMR spectrum of F VIII–vWf fraction 3 shows the characteristic features of an oligosaccharide of the *N*-acetyllactosaminic type, derived from a carbohydrate unit *N*-glycosidically linked to asparagine of a glycoprotein. The presence of the usual mannotriose (4-3-4′) branching core is clearly deducible from the occurrence of the Man H-1 and H-2 signals. For Man-4, they are found at δ = 5.133 and 4.195 ppm; for Man-3, at $\delta \simeq$ 4.78 and 4.253 ppm; and for Man-4′, at δ = 4.926 and $\simeq$ 4.11 ppm, respectively. From these chemical shifts it can be concluded that a diantennary type of branching is concerned [17].

Table 2

Molar ratios[a] of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysate of the permethylated major *N*-glycan isolated from F VIII–vWf

Monosaccharide methyl ethers	Fraction 3
(2,3,4)-Me_3-Fuc	0.8
(2,3,4,6)-Me_4-Gal	1.0
(2,3,4)-Me_3-Gal	1.2
(3,4,6)-Me_3-Man	2.0
(2,4)-Me_2-Man	1.2
(3,6)-Me_2-GlcNAc(Me)	2.6
(3)-Me_1-GlcNAc(Me)	0.8
(4,7,8,9)-Me_4-NeuAc(Me)	0.9

[a] The molar ratios were calculated on the basis of 2 residues of (3,4,6)-Me_3-Man

As to the extension of the core at the peripheral side, one of the two *N*-acetyllactosamine units that are β(1→2)-linked to Man-4 and -4′, bears a NeuAc residue in α(2→6)-linkage to Gal. Evidence stems from the chemical shifts (δH-3ax = 1.718 ppm; δH-3eq = 2.669 ppm; δNAc = 2.030 ppm) and the relative intensities of the NeuAc structural-reporter groups (cf. [17]), as well as from the presence of two distinct sets of reporter-group signals for the *N*-acetyllactosamine units. The sialylated branch possesses the anomeric doublets of Gal and GlcNAc at δ = 4.445 and 4.606 ppm, respectively. The asialo counterpart shows H-1 doublets for Gal and GlcNAc at δ = 4.469 and 4.581 ppm, respectively. Localization of NeuAc in a certain branch could be readily achieved on the basis of the chemical shifts of the α-Man H-1 signals [17]. The chemical shift value for H-1 of Man-4 (δ = 5.133 ppm) points unambiguously to the presence of the α(2→6)-linked NeuAc in the upper (i.e., 4-5-6) branch, whereas δH-1 for Man-4′ (4.926 ppm) confirms the asialo character of the lower branch. This location of the NeuAc residue in the upper branch is corroborated by the chemical shifts of the *N*-acetyl signals of GlcNAc-5 (δ = 2.069 ppm, pointing to (2→6)-sialylation of the 5-6 branch) and GlcNAc-5′ (δ = 2.048 ppm, indicating that Gal-6′ is the terminal residue in the lower branch) [17].

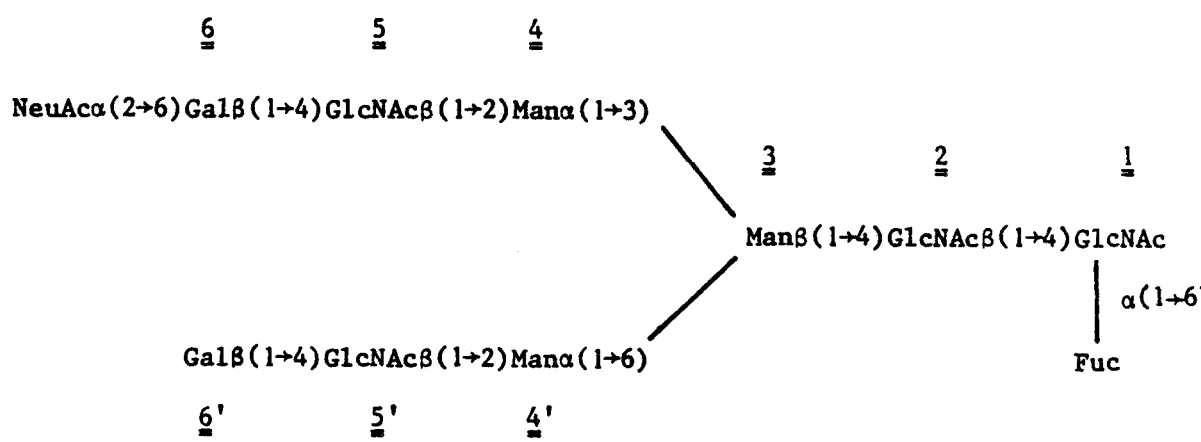


Fig.2. Primary structure of the major *N*-glycosidic glycan of F VIII–vWf.

Regarding the extension of the core at the reducing end, the Man-3 is $\beta(1\rightarrow4)$-linked to an *N,N'*-diacetylchitobiose unit which bears a Fuc residue in $\alpha(1\rightarrow6)$-linkage to GlcNAc-1. The presence of the GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ [Fuc $\alpha(1\rightarrow6)$] GlcNAc structural element comes to expression in the occurrence of doublets for the anomeric protons of GlcNAc-2 (δH-1 $\simeq$ 4.68 ppm) and Fuc (δH-1 $\simeq$ 4.87 ppm). The H-5 and CH_3 signals of Fuc, at $\delta \simeq$ 4.11 and 1.208 ppm, respectively, point to its $\alpha(1\rightarrow6)$-linkage to GlcNAc-1. In addition to the chemical shift for H-1 of GlcNAc-2, the position of its *N*-acetyl signal is decisive for the presence of Fuc in $\alpha(1\rightarrow6)$-linkage to GlcNAc-1 [17]. The latter signal is, for the larger part ($\simeq$ 90%), observed at δ = 2.096 ppm, whereas only a minor part is found at δ = 2.080 ppm, indicating that most of the chains bear such a Fuc residue.

Based on the aforementioned NMR results, and those of the methylation analysis (table 2), the primary structure of F VIII–vWf fraction 3, representing the major *N*-glycosidic glycan of this glycoprotein, is established to be as depicted in fig.2. The structure is identical to that of human lactotransferrin glycopeptide D [18], and also to that of glycopeptide fraction B, derived from secretory immunoglobulins A from human milk [19]. Comparison of the 500 MHz ^{1}H-NMR data for the F VIII–vWf fraction 3 described here with those acquired at 360 MHz for the aforementioned glycopeptides reveals that the reducing character of the oligosaccharide released by hydrazinolysis and *N*-reacetylation does not markedly influence the chemical shifts of the structural-reporter groups of Fuc $\alpha(1\rightarrow6)$-linked to GlcNAc-1 nor those of GlcNAc-2, $\beta(1\rightarrow4)$-linked to GlcNAc-1. Obviously, the reporter-groups of GlcNAc-1 differ considerably when comparing oligosaccharide and glycopeptides (e.g., the NAc resonance of GlcNAc-1 is found here at δ = 2.039 ppm). Nevertheless, it should be emphasized that this study shows again the general applicability of the structural-reporter-group concept for the identification of glycopeptides, oligosaccharides and oligosaccharide-alditols [17,20].

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (LA no.217), by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique (Contrat 81-L-0433), by the Centre Régional de Transfusion Sanguine, by the Fondation pour la Recherche Médicale, by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and by grant UUKC-OC 79-13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF). We thank Yves Leroy for his expert technical assistance.

REFERENCES

[1] Sodetz, J.M., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5538–5546.
[2] Gralnick, H.R. (1978) J. Clin. Invest. 62, 496–499.
[3] Sodetz, J.M., Paulson, J.C., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7202–7206.
[4] Kao, K.J., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10134–10139.
[5] Morisato, D.K. and Gralnick, H.R. (1980) Blood 55, 9–15.
[6] De Marco, L. and Shapiro, S.S. (1981) J. Clin. Invest. 68, 321–328.
[7] Gralnick, H.R., Cregger, M.C. and Williams, S.B. (1982) Blood 59, 542–548.
[8] Samor, B., Mazurier, C., Goudemand, M., Debeire, P., Fournet, B. and Montreuil, J. (1982) Thromb. Res. 25, 81–89.
[9] Mazurier, C., Parquet-Gernez, A., Samor, B., Goudemand, M. and Montreuil, J. (1979) C.R. Acad. Sc. Paris 288, 1431–1434.
[10] Bayard, B. and Montreuil, J. (1974) in: Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués (Montreuil, J. ed) Coll. Intern. CNRS no.221, Editions du CNRS, Paris, pp. 209–218.
[11] Reading, C.L., Penhoet, E. and Ballou, C. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5600–5612.
[12] Grimmonprez, L. and Montreuil, J. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 843–855.
[13] Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) FEBS Lett. 50, 296–299.
[14] Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) J. Chromatogr. 69, 291–301.
[15] Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) Carbohydr. Res. 80, 336–339.
[16] Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489–502.
[17] Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeek, H. and Dorland, L. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 45–77.

[18] Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 413–419.

[19] Pierce-Crétel, A., Pamblanco, M., Strecker, G., Montreuil, J., Spik, G., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 383–388.

[20] Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L. and Van Halbeek, H. (1982) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, in press.

IV - LES GLYCANNES MINEURS DE TYPE N-GLYCOSIDIQUE DU F-VIII/vWf.

Le glycanne majeur du F-VIII/vWf, dont nous venons de déterminer la structure primaire, est du type N-acétyllactosaminique, biantenné, monosialylé et possédant un résidu de fucose sur la N-acétylglucosamine du point d'attache (voir Figure 2, p. 112). Mais le F-VIII/vWf présentait une très grande hétérogénéité structurale de ses glycannes puisque nous avons pu séparer 5 familles d'oligosaccharides par électrophorèse sur papier à haut voltage et que leur analyse par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) montrait que, hormis le glycanne majeur, il ne s'agissait pas de familles homogènes. Afin de préciser l'étendue de cette hétérogénéité, nous avons poursuivi le fractionnement de ces composés, essentiellement par chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B (les conditions expérimentales sont présentées p. 65). Il faut d'abord préciser que les résultats issus des séparations électrophorétiques et chromatographiques sur couche mince se sont révélés reproductibles en partant de différentes préparations de F-VIII/vWf, tant du point de vue quantitatif que qualitatif, et nous avons donc rassemblé les fractions oligosaccharidiques neutres, monosialylées et disialylées (fractions 1 à 5) issues d'électrophorèses préparatives à haut voltage de deux fractionnements (2 x 10 mg de F-VIII/vWf délipidé).

La spécificité de la ConA (DEBRAY et MONTREUIL -344-) nous a permis d'obtenir pour chacune des 5 fractions oligosaccharidiques deux sous-fractions : l'une non retenue sur la colonne et ne présentant donc pas d'affinité pour la ConA (fraction non retenue : FNR) et l'autre, retenue sur la colonne de ConA -Sepharose 4B et éluée par l' α-MeGlc 10 mM (FE_{10mM}). Une troisième fraction éluée par l'α-Me.Glc 0,3 M a été retrouvée, mais à l'état de traces, à partir de la fraction neutre. Les résultats de ce fractionnement et l'analyse des différentes sous-

fractions oligosaccharidiques en T.L.C. nous sont présentés respectivement dans le Tableau VI, (p.118) et la Figure 13 (p.119) et peuvent se résumer de la manière suivante.

1 - Les glycannes du F-VIII/vWf sont constitués par 76 % d'oligosaccharides biantennés présentant une légère affinité pour la Con A : 59 % représentent le glycanne majeur décrit précédemment (2-FE_{10mM} et 3-FE_{10mM}) ; 5 % un glycanne biantenné neutre homogène en T.L.C. (1-FE_{10mM}) et 12,7 %, des glycannes biantennés disialylés (4-FE_{10mM} et 5-FE_{10mM}) qui donnent deux taches en T.L.C.

2 - Le reste des glycannes (24 %) ne présentent pas d'affinité pour la Con A-Sépharose 4B et sont donc composés d'oligosaccharides tri- ou tétraantennés ou biantennés possédant une N-acétylglucosamine intercalaire : 5 % sont neutres et se séparent en deux bandes en T.L.C. (1-FNR) ; 9 % représente un oligosaccharide homogène en T.L.C. (2-FNR) ; 9,3 % sont disialylés et donnent 2 taches (4-FNR) ou 3 (5-FNR) en T.L.C.

3 - En outre, l'analyse de la T.L.C. de la Figure 13 (p. 119) montre que les fractions 4-FE_{10mM} et 5-FE_{10mM} sont composées des deux mêmes oligosaccharides (4c et 5c ; 4d et 5d), ceci étant dû au fait que la fraction 4-FE_{10mM} est une contamination du pic 4 lors de l'électrophorèse préparative à haut voltage. On retrouve le même phénomène pour les fractions 4-FNR et 5-FNR, où les oligosaccharides 4a et 4b migrent respectivement comme les oligosaccharides 5a et 5b.

4 - La fraction 5 FNR (voir Figure 13; p. 119) contient un oligosaccharide (5b') qui, du fait de son comportement en électrophorèse et en T.L.C. devrait être trisialylé, mais lourd puisqu'il migre en électrophère comme un glycanne biantenné disialylé.

5 - Néanmoins un problème majeur subsiste concernant la migration anormale en T.L.C. des oligosaccharides disialylés 4a et 4c, puisqu'elle est plus rapide que celle du témoin biantenné disialylé

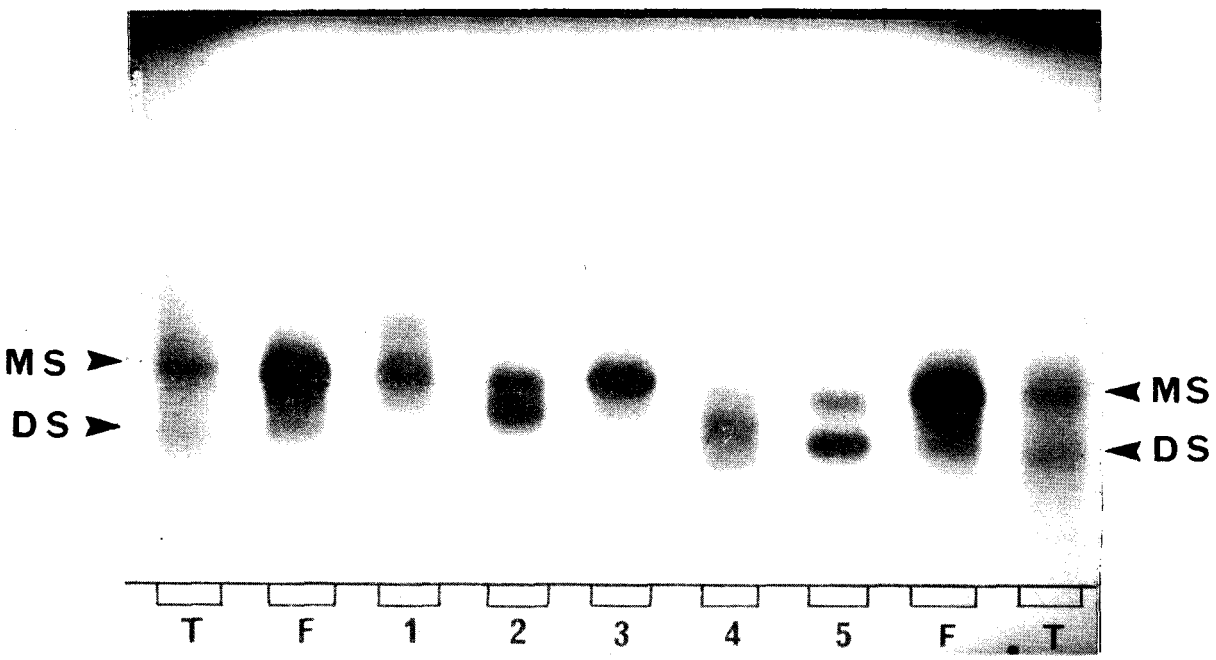


Figure 12 - Autoradiographie d'une T.L.C. des glycannes libérés par hydrazinolyse du F-VIII/vWf et préalablement séparés par électrophorèse à haut voltage sur papier en 5 fractions.(voir p.111).F: glycannes totaux du F-VIII/vWf; 1:fration neutre;2 et 3:fractions monosialylées; 4 et 5:fractions disialylées;T:glycannes biantennés mono-(MS) et disialylés(DS) témoins libérés de la sérotransferrine humaine par hydrazinolyse. (Pour les conditions expérimentales, se reporter au chapitre Matériel et Méthodes, p.61).

BU LILLE

TABLEAU VI - Résultats du fractionnement des glycannes du FVIII/vWf, libérés par hydrazinolyse, par électrophorèse préparative à haut voltage sur papier.(Les conditions expérimentales sont décrites dans le paragraphe Matériels et Méthodes, p. 61).

	N-glycannes totaux	Fraction I	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
Composition centésimale en glucides % (a)	I00	I0	8	60	6	I6
% de la radioactivité des fractions non retenues sur ConA-Sepharose (b)	44	57	68	I0	74	26
% de la radioactivité des fractions éluées de la ConA-Sepharose par l' α-Me. Glc I0 mM	56	4I	32	90	26	74
% de la radioactivité des fractions éluées de la ConA-Sepharose par l' α-Me. Glc 0,3 M	ε	2	0	0	0	0

(a) Ces résultats sont exprimés en % de la composition centésimale totale en monosaccharides.

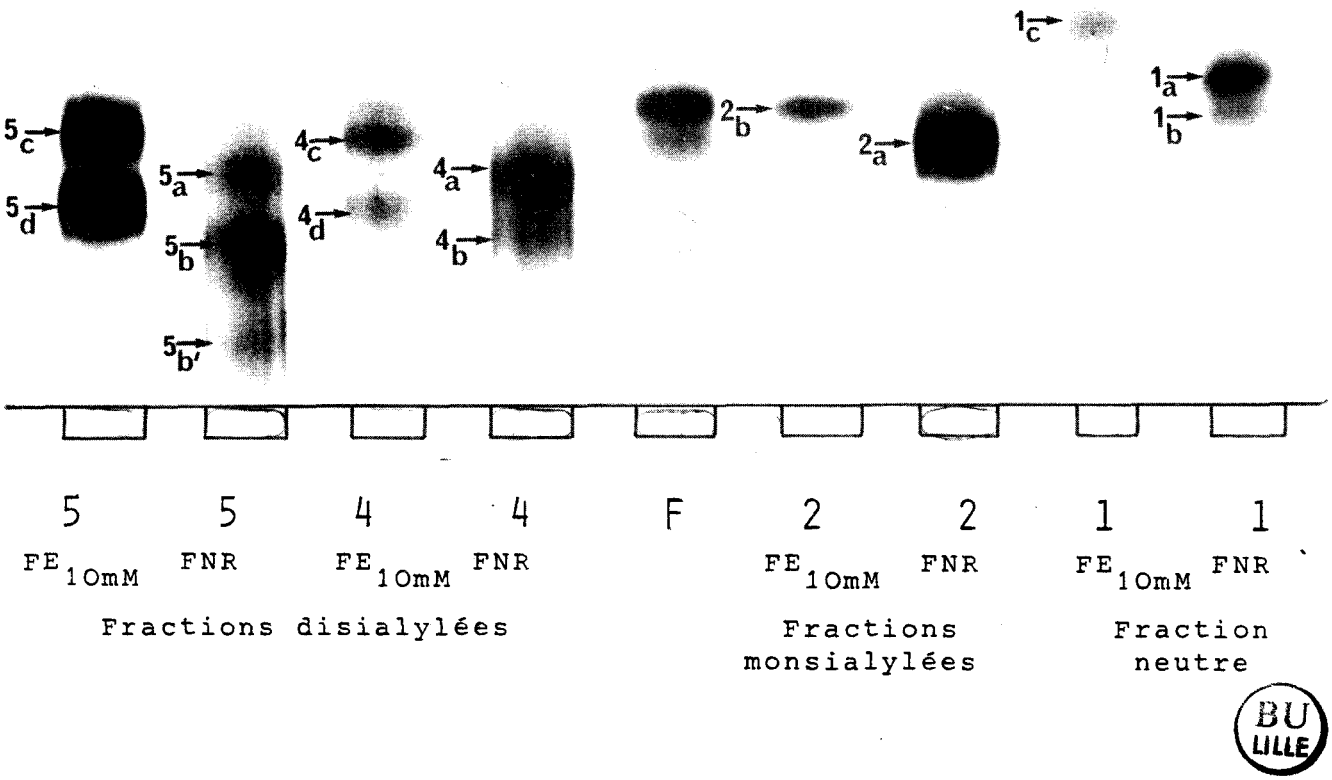
(b) Ces résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale de chaque fraction.

TABLEAU VII - Composition molaire[a] en monosaccharides des glycannes du FVIII/vWf obtenus par hydrazinolyse/N-réacétylation. Ces oligosaccharides ont été préalablement séparés par électrophorèse à haut voltage sur papier et par chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B. (Pour les conditions expérimentales,se reporter au chapitre Matériel et Méthodes, p.61).

BU LILLE

Monosaccharide	1-FNR	1-FE_{10mM}	2-FNR	4-FNR	4-FE_{10mM}
Fuc	1	1	1	0,4	N.D[b]
Man	3	3	3	3	N.D
Gal	4	2	3,4	3	N.D
GlcNAc	3,6	4	5,3	4,5	N.D
NeuAc	-	-	1	2	N.D

[a]Calculé sur la base de 3 résidus de mannose. [b]Les rapports molaires en monosaccharides de cette fraction n'ont pu être déterminés.



BU LILLE

Figure 13 - Autoradiographie d'une T.L.C. des glycannes de type N-glycosidique du F-VIII/vWf obtenus par hydrazinolyse/ N-(^{14}C) réacétylation.Ces oligosaccharides ont été préalablement séparés par électrophorèse à haut voltage sur papier et par chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B; F: glycannes totaux du F-VIII/ vWf.(Pour les conditions expérimentales, se reporter au chapitre Matériel et Méthodes, p. 61).

(voir Figure 13 ; p. 119). Une explication possible de ce phénomène serait la présence sur ces glycannes de résidus d'acide N-acétylneuraminique, liés en α-2,3 sur le galactose, qui provoqueraient ces artefacts de migration (Dr G.STRECKER, communication personnelle).

Au total, nous avons identifié 10 glycannes différents mais ces travaux n'ont pu être complétés par des études structurales classiques (méthylation, R.M.N.) puisque nous ne disposions que de quelques dizaines de µg de chacune de ces fractions. Néanmoins la composition molaire de certains de ces composés a pu être déterminée après méthanolyse, et nous a permis de vérifier en partie ces hypothèses structurales (voir Tableau VII ; p. 118).

V - CONCLUSIONS.

Il aurait été intéressant de compléter ces études structurales par des études sur le F-VIII seul ainsi que sur le F-VIII/vWf de malades de Willebrand, mais on se heurtait à des problèmes de quantité de matériel disponible. Le F-VIII ne représente que moins de 1 % du complexe et il a fallu, à titre d'exemple, 125 litres de plasma de boeuf à VEHAR et DAVIE (-345-), pour purifier 400 µg de F-VIII. Le même type de difficulté se posait pour aborder l'étude structurale des glycannes du F-VIII/vWf de malades de Willebrand. Mais la méthodologie que nous avons mise au point, nécessitant quelques dizaines de µg d'oligosaccharides, pourrait permettre, dans un premier temps, la constitution d'une carte chromatographique des glycannes de type N-glycosidique du F-VIII/vWf isolé du plasma de ces malades afin de préciser le rôle de ces composés dans l'hémostase primaire.

ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES CHAINES GLYCANNIQUES DES IgM NORMALES ET DE MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTROM

Ces travaux sont issus d'une collaboration avec Madame Annie CAHOUR, Chargé de Recherche au C.N.R.S. (Laboratoire de Chimie Clinique et de Biologie Moléculaire de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris ; Directeur : Professeur L. HARTMANN), lors d'un stage de trois ans qu'elle effectua au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I.

Les IgM normales représentent une population de molécules dont l'hétérogénéité est en relation avec celle de la population lymphoplasmocytaire responsable de leur biosynthèse. Inversement, les IgM pathologiques de macroglobulinémie de Waldenström, issues de la prolifération maligne d'un clone de cellule lymphoplasmocytaire, sont monoclonales. Dans les sérums humains normaux, les IgM sont présentes à une concentration variant de 0,3 à 1,0 g/l tandis que dans la maladie de Waldenström, leur taux dépasse 10 g/l de peut même atteindre 60 g/l et correspond à la prédominance anormale dans le sang d'un type moléculaire normal.

Les IgM comportent de 8 à 12 % de glycannes liés à la protéine uniquement par des liaisons de type N-glycosidique (CLAMP et JOHNSON -346-) qui interviendraient dans la modification de leur conformation, de la forme libre flexible, en forme complexée rigide (en présence d'antigène) (HUBER et al. -347-).

L'objectif des recherches de Mme. CAHOUR était de répondre aux questions suivantes :

1 - retrouvait-on les mêmes types de structures glycanniques dans les IgM normales et de macroglobulinémie de Waldenström ?

2 - si des différences existaient, étaient-elles qualitatives ou quantitatives ?

3 - pouvait-on dégager un marqueur glycannique diagnostique dans la macroglobulinémie de Waldenström ?

CAHOUR et al. (-348-) avaient comparé la composition en monosaccharides de 8 échantillons d'IgM normales et de 18 échantillons d'IgM de macroglobulinémie de Waldenström. Des différences appréciables de leur composition centésimale en glucides leur avaient permis de définir deux familles parmi les IgM pathologiques ayant respectivement une teneur moyenne de 7,3 ± 0,4 % (12 IgM) et de 10 ± 0,9 % (6 IgM), les IgM normales comportant 7,2 ± 0,4 % de glucides. Mais l'examen des rapports molaires obtenus pour les différents monosaccharides ne révélait pas de différence significative pour un résidu particulier et la recherche de différences structurales entre les IgM normales et pathologiques ne pouvait passer que par l'utilisation d'une méthodologie fine d'étude des glycannes.

Nous avons limité notre choix à 3 IgM disponibles en quantité suffisante : 2 IgM pathologiques comportant 7 % et 10 % de glucides (IgM-7, ZAJ ; IgM-10, GRA) et un mélange d'IgM normales.

Dans un premier temps, nous nous sommes attaché à comparer, sur les bases des données chromatographiques, les différents glycannes présents dans ces 3 IgM. Ces travaux font l'objet de la publication suivante où nous avons pu montrer que comparativement aux IgM normales, les IgM pathologiques apparaissaient :

- soit enrichies en structures de type N-acétyllactosaminique les "plus complexes" : c'est le cas de l'IgM-10 qui possède 58 % d'oligosaccharides non retenus sur ConA (se reporter au chapitre Matériel et Méthodes, p. 65) contre 40 % pour les IgM normales. Ces 2 populations d'IgM possèdant 80 % de structures du type N-acétyllactosaminique, l'augmentation de la fraction A dans l'IgM-10 se fait au détriment de la fraction biantennée (Fraction B, éluée de la ConA par l'α-Me.Glc 10 mM) ;

- soit enrichies en structures oligomannosidiques (fraction C, éluée de la ConA par l'α-Me.Glc 0,3 M) : c'est le cas de l'IgM-7 qui possède 32 % de glycannes oligomannosidiques

contre 20 % pour les IgM normales. Les pourcentages de structures biantennées étant identiques dans les 2 populations, l'augmentation de la fraction C dans l'IgM-7 se fait aux dépends de la fraction A (27 % contre 40 % pour les IgM normales).

Biochem. J. (1983) **211**, 55–63
Printed in Great Britain

Comparative study of the carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M

Annie CAHOUR,* Philippe DEBEIRE,† Lucien HARTMANN*‡ and Jean MONTREUIL†
**Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Chimie Clinique et de Biologie Moléculaire (U.202 I.N.S.E.R.M. and ERA 696 C.N.R.S.), 15 Rue de L'École de Médecine, 75270 Paris Cédex 06, France, and*
†Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique (LA 217 C.N.R.S.), 59655 Villeneuve d'Ascq, France

(*Received 2 August 1982/Accepted 10 December 1982*)

The well-known heterogeneity of normal and pathological immunoglobulins M was investigated in a study involving the characterization of their carbohydrate moieties. Oligosaccharide units were released from the native molecule by hydrazinolysis, and they were fractionated by affinity chromatography on a concanavalin A–Sepharose column to yield separate *N*-acetyl-lactosaminic-type and oligomannosidic-type structures. Further identification of these oligosaccharides was attempted by t.l.c. on silica gel and by determination of their monosaccharide compositions. A comparative study of the oligosaccharide units belonging to each population of immunoglobulin M was possible. Similarities were found in the occurrence of both types of oligosaccharide structures, and, in addition, a common double heterogeneity could be demonstrated for *N*-acetyl-lactosaminic-type structures: they could be resolved by affinity chromatography into bi-, tri- and tetra-antennary structures, and they also showed differences in *N*-acetylneuraminic acid content. Though some variations were observed in the exact composition of the oligosaccharide units within each population, it was possible to consider a representative oligosaccharide-unit composition of normal immunoglobulin M as a standard for comparison. On this basis a predominance of multi-antennary structures was observed in the more glycosylated pathological immunoglobulins M (10% carbohydrate content), whereas oligomannosidic structures were increased in pathological immunoglobulins M with a lower content of carbohydrates (7%). These variations are thought to reflect differences in the biosynthetic processing pathway of the carbohydrate units of the pathological immunoglobulins M or the enhanced expression of a molecular clone.

Human IgM molecules are glycoproteins with large amounts of carbohydrate (7–15%) (Clamp & Johnson, 1972). In a recent investigation (Cahour *et al.*, 1981) a sampling of 18 monoclonal IgM species was resolved into two populations on the basis of their carbohydrate content: 12 IgM species contained 7.3% carbohydrate and six IgM species contained 10%. An average value of 7.2% carbohydrate content has been found for normal IgM. It is well known that these plasma proteins (Jouanneau *et al.*, 1970; Shimizu *et al.*, 1971; Hickman *et al.*, 1972), as do many glycoproteins (for a review see Montreuil, 1982), contain both-*N*-acetyl-lactosaminic-type and oligomannosidic-type asparagine-bound carbohydrate chains.

Abbreviation used: IgM, immunoglobulin M.

‡ To whom correspondence should be addressed.

Commonly, the techniques used for structural investigations of the carbohydrate moieties of immunoglobulins include a digestion with Pronase and subsequent fractionation of the resultant glycopeptides by gel filtration and ion-exchange chromatography.

In the present investigation, by using the combination of hydrazinolysis, affinity chromatography and g.l.c., the oligosaccharide units obtained directly from the native IgM were studied. Their resolution and their characterization in each IgM population were monitored by t.l.c. on silica gel.

The IgM oligosaccharide units could play a biological role either by interaction with membrane receptors or by acting directly on the conformation of the molecules, and we were interested in making a comparison of these structures both in normal and pathological IgM species. Some preliminary results

relevant to this aspect are reported in the present paper.

Experimental

Materials

Silica gel 60 thin-layer plates (0.2 mm layer), solvents and chemicals of analytical grade were products of Merck (Darmstadt, Germany). Concanavalin A–Sepharose 4B was supplied by Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden), and methyl α-D-glucoside by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). NaB^3H_4 (36 Ci/mmol) was purchased from the Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France), and the scintillation mixture (Aqualyte™) was a product from J. T. Baker Chemicals BV (Deventer, The Netherlands). Bio-Gel P-2 (200–400 mesh) was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.), and hydrazine was obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, U.S.A.).

Reference oligosaccharides

The following standard compounds (Table 1) were used for a provisional identification of carbohydrate units assayed by t.l.c. Oligosaccharides S_0, S_1 and S_2 were bi-antennary structures, respectively desialylated, monosialylated and disialylated, obtained from human serum transferrin by the procedure of Spik *et al.* (1975). Oligosaccharides O_3 and O_4 were tri- and tetra-antennary asialoglycans respectively obtained from human plasma α_1-acid glycoprotein (orosomucoid) (Fournet *et al.*, 1978). Oligomannosides with four to nine mannose residues (oligosaccharides M'_4–M'_9) were isolated from urine of patients with mannosidosis (Strecker *et al.*, 1976).

Preparation of immunoglobulins

IgM species were prepared and checked for homogeneity as described previously (Cahour *et al.*, 1981). Monoclonal IgM species were obtained from plasmaphaereses of patients with Waldenström's macroglobulinaemia, and polyclonal IgM species were isolated from individual normal sera.

Hydrazinolysis

Specific cleavage of *N*-acetylglucosamine–asparagine *N*-glycosylaminic linkages was performed as described previously (Bayard & Montreuil, 1974) by the action of anhydrous hydrazine on native protein (1 mg) for 20 h at 85°C. *N*-Deacetylated glycans were obtained after drying of the hydrazinolysate under N_2 and elimination of traces of the reaction products under vacuum in the presence of conc. H_2SO_4, and after a further desalting on a Bio-Gel P-2 column (1.5 cm × 32 cm) they were eluted with aq. 1% (v/v) acetic acid. *N*-Reacetylation was performed with acetic anhydride as described by Reading *et al.* (1978), and the oligosaccharide fractions were purified on Bio-Gel P-2.

Radioisotopic labelling of oligosaccharides

Reduction with NaB^3H_4 was performed as described by Takasaki & Kobata (1978). About 100 nmol of oligosaccharide was reduced with 8 nmol (0.30 mCi) of NaB^3H_4 in 300 μl of 10 mM-NaOH for 4 h at 25°C. Then 10 mg of $NaBH_4$ was added and the sample was kept for a further 2 h at 25°C. The reaction was stopped by adding 1 drop of acetic acid, and after the mixture had been passed through a small column of Dowex 50W X8 (H^+ form) the boric acid was removed by co-distillation under vacuum three times with methanol. Next, descending paper chromatography for 16 h on Whatman no. 1 paper with the solvent system butan-1-ol/ethanol/water (16:1:4, by vol.) removed radioactive contaminants derived from the NaB^3H_4. Reduced oligosaccharides were eluted with water and purified on Bio-Gel P-2.

Affinity chromatography of oligosaccharides on concanavalin A–Sepharose

NaB^3H_4-reduced oligosaccharides were applied to a concanavalin A–Sepharose column (1.5 cm × 9.5 cm) equilibrated with 10 mM-sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 1 mM-$CaCl_2$, 1 mM-$MgCl_2$, 1 mM-$MnCl_2$ and 0.1 M-NaCl. Fractionation was performed by stepwise elution with methyl α-D-glucoside, with reference to previous studies of the binding capacities of concanavalin A for carbohydrate structures (Debray & Montreuil, 1978; Narasimhan *et al.*, 1979). For this purpose a previous calibration of the concanavalin A–Sepharose column was monitored with oligosaccharides of known structures. The tri- and tetra-antennary glycans oligosaccharides O_3 and O_4 (see Table 1), with no affinity for the column, were eluted with starting buffer. Bi-antennary oligosaccharides (i.e. reference oligosaccharides of serum transferrin) were bound with low affinity by the lectin and were eluted with 0.01 M-methyl α-glucoside, whereas oligomannosidic oligosaccharides (see Table 1) were strongly bound by concanavalin A and needed 0.3 M-methyl α-glucoside for their elution. ^3H radioactivity was counted in 3 ml of scintillation solution in a Beckman liquid-scintillation spectrometer.

T.l.c.

Oligosaccharides were resolved on silica gel 60 thin-layer plates with the following solvent systems: F, a fast one (Bayard *et al.*, 1979), ethanol / butan-1-ol / pyridine / water / acetic acid (100:10:10:30:3, by vol.), for *N*-acetyl-lactosaminic oligosaccharides, and S, a slow one (Palo & Savolainen, 1972), butan-1-ol / acetic acid / water

Table 1. *Reference oligosaccharides used for t.l.c.*

Type of structure	Bi-antennary *N*-acetyl-lactosaminic type
Origin	Human serum transferrin
Structures	

Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–3)\
Man(β1–4)GlcNAc(β1–4) GlcNAc
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–6)/

Oligosaccharide S_0

NeuAc(α2–6)Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–3)\
Man(β1–4)GlcNAc(β1–4) GlcNAc
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–6)/

Oligosaccharide S_1

NeuAc(α2–6)Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–3)\
Man(β1–4)GlcNAc(β1–4) GlcNAc
NeuAc(α2–6)Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–6)/

Oligosaccharide S_2

Type of structure	Tri- and tetra-antennary *N*-acetyl-lactosaminic type
Origin	Human plasma α_1-acid glycoprotein
Structures	

Gal(β1–4)GlcNAc(β1–4)\
Man(α1–3)\
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)/
Man(β1–4)GlcNAc(β1–4) GlcNAc
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)Man(α1–6)/

Oligosaccharide O_3*

Gal(β1–4)GlcNAc(β1–4)\
Man(α1–3)\
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)/
Man(β1–4)GlcNAc(β1–4) GlcNAc
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–2)\
Man(α1–6)/
Gal(β1–4)GlcNAc(β1–6)/

Oligosaccharide O_4

Type of structure	Oligomannosidic type
Origin	Urines of oligomannosidosis patients
Structures	

Man(α1–3)\
Man(α1–4)GlcNAc
Man(α1–3)\
Man(α1–6)/
Man(α1–6)/

Oligosaccharide M'_5

Man(α1–2) [Man(α1–3)\ Man(α1–3)\ Man(α1–4)GlcNAc / Man(α1–6)/ Man(α1–6)/]$_{1-4}$

Oligosaccharides M'_6–M'_9

BU LILLE

* Asialo tri-antennary glycans or orosomucoid may possess an additional fucose residue α-1,3-linked to the *N*-acetyl-glucosamine residue 7 (oligosaccharide O_3F).

(2:1:1, by vol.), for oligomannosidic glycans. Migrating bands were detected by using orcinol (200mg of orcinol in 100ml of aq. 20% H_2SO_4) spray reagent with heating at 110°C for 10min.

G.l.c.

Conditions for g.l.c. were those described by Zanetta *et al.* (1972). *O*-Methylated glycosides were analysed as trifluoroacetate compounds on a glass column packed with 3% OV 210, with a temperature gradient of 2°C/min from 100 to 220°C. *meso*-Inositol was used as internal standard.

Desialylation

Desialylation was performed by mild acid hydrolysis (0.1 M-trifluoroacetic acid for 30min at 80°C) and was checked by t.l.c. with solvent F. Untreated oligosaccharide served as the control.

Results

Comparative t.l.c. of the whole oligosaccharide chains

Hydrazinolysis was performed on normal IgM species and on pathological IgM species with increasing contents of carbohydrates, i.e. 7% (IgM-7), 8% (IgM-8), 9% (IgM-9) and 10% (IgM-10). The released oligosaccharides were analysed by t.l.c. on silica gel in the solvent F (Fig. 1). All preparations of normal IgM exhibited the same pattern, an example of which is given (see Fig. 1, slot 1). For both polyclonal and monoclonal preparations of pathological IgM, patterns essentially consisted of the same bands, numbered I to VIII. A classification within three groups could be made: the first one included IgM-8 and IgM-9, t.l.c. profiles of which resembled that obtained with normal IgM; the

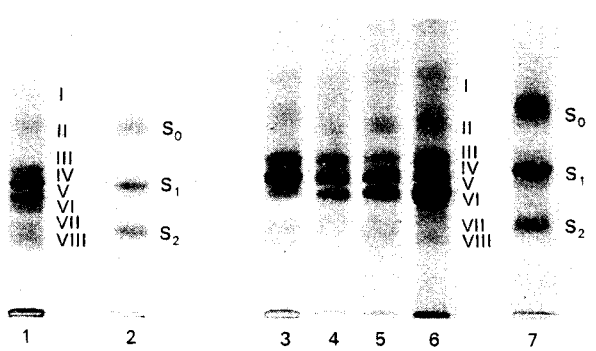


Fig. 1. *Comparative t.l.c. of the whole glycans liberated by hydrazinolysis from normal and pathological IgM species*

For full experimental details see the text. Solvent system F was used. Slot 1, normal IgM; slots 2 and 7, standards of asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin; slots 3–6, pathological IgM species containing 7%, 8%, 9% and 10% carbohydrate respectively.

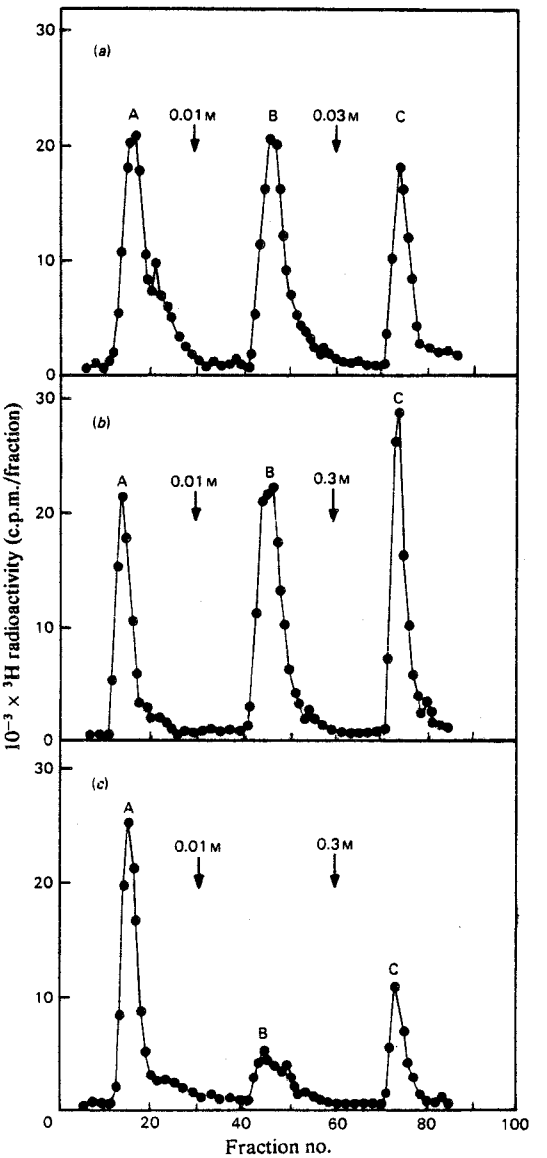


Fig. 2. *Fractionation by affinity chromatography on a concanavalin A–Sepharose 4B column (1.5 cm × 9.5 cm) of the oligosaccharides liberated by hydrazinolysis of IgM species*

For full experimental details see the text. The flow rate was 9ml/h. Fractions of volume 1ml, numbered in order of their emergence from the column, were collected and counted for radioactivity. Arrows indicate the starting of the elution of fractions B and C with 0.01 M- and 0.3 M-methyl α-D-glucopyranoside respectively. Profiles obtained: (*a*) for normal IgM; (*b*) for pathological IgM-7; (*c*) for pathological IgM-10.

second and the third groups were represented by monoclonal IgM-7 and IgM-10, with characteristic patterns different from those of the first group. Enrichments of band IV for IgM-7 and of band VI for IgM-10 were observed. These variations were not accompanied by significant differences in the molar monosaccharide composition (Table 2).

Fractionation of oligosaccharides by affinity chromatography on concanavalin A–Sepharose

Because of the small quantity of IgM-8 and IgM-9 at our disposal, further studies were limited to normal IgM and to the pathological IgM-7 and IgM-10. Fractionation on concanavalin A–Sepharose of glycans released by hydrazinolysis, *N*-reacetylated and then reduced gave three elution patterns corresponding to the three families of IgM (Fig. 2). Each profile possessed the three fractions A, B and C eluted with starting buffer, 0.01 M-methyl α-glucoside and 0.3 M-α-methyl glucoside respectively.

Qualitatively the pattern obtained for polyclonal IgM resembled that of pathological IgM-7, but quantitatively marked differences were observed in the percentage distribution of fractions (see Table 2). On the one hand *N*-acetyl-lactosaminic units (fractions A and B) were predominant in normal IgM and pathological IgM-10, with 80% of the label. On the other hand, pathological IgM-7 was enriched in high-mannose oligosaccharides (32% against 20% for the two other populations). In addition, for *N*-acetyl-lactosaminic glycans variations were observed in the proportions of tri- and tetra-antennary structures (fraction A) and bi-antennary structures (fraction B). The proportions were equivalent for polyclonal IgM, but the degree of branching was increased for monoclonal IgM-10 whereas it was decreased for monoclonal IgM-7.

Characterization of the carbohydrate chains

To investigate the extent of the heterogeneity exhibited by the carbohydrate moieties of IgM, oligosaccharidic fractions were submitted to g.l.c. after methanolysis (Table 2). The molar proportions obtained were in good agreement with those expected after fractionation of the hydrazinolysates on concanavalin A–Sepharose, and were characteristic of chiefly tri-antennary structures for fraction A, bi-antennary structures for fraction B and oligomannosidic structures for fraction C.

In addition, the usefulness of the t.l.c. method in the further qualitative resolution of IgM oligosaccharide is demonstrated in Fig. 3. In fraction A (Fig. 3*a*), for the three samples essayed, four migrating oligosaccharides were identified (bands IV, V_1, VI and VIII), with a predominance of band VI. A double band in the position for this band VI was noted with polyclonal IgM. This double band might represent oligosaccharides with similar structure but with a possible additional fucose residue on the component forming the slower-migrating band.

Table 2. *Carbohydrate compositions of native IgM glycans and of oligosaccharidic fractions produced by affinity chromatography on immobilized concanavalin A after hydrazinolysis of IgM*

For full experimental details see the text. Results for native IgM glycans obtained after g.l.c. were the same for both native IgM glycans and hydrazinolysates; data for normal IgM and pathological IgM-7 and IgM-10 are corrected and expressed in terms of the sum of the percentage distribution of the fractions A, B and C. Results for the concanavalin A—Sepharose fractions are normalized to 3.0 mannose residues for fractions A and B and of 2.0 *N*-acetylglucosamine residues for fraction C. L refers to structures of the *N*-acetyl-lactosaminic type, and M to structures of the oligomannosidic type.

	Carbohydrate composition (molar proportions)													
					Pathological IgM									
	Normal IgM				IgM-7				IgM-8	IgM-9	IgM-10			
		Concanavalin A fractions				Concanavalin A fractions						Concanavalin A fractions		
	Native IgM	A	B	C	Native IgM	A	B	C	Native IgM	Native IgM	Native IgM	A	B	C
% of radioactivity	...	40	40	20	—	27	41	32	—	—	—	58	24	18
% of L and M structures	...	80		20	—	68		32	—	—	—	82		18
Fucose	0.67	0.77	0.4	—	0.52	0.80	0.70	—	0.76	0.73	0.79	0.98	0.78	—
Mannose	4.1	3.0	3.0	6.2	4.1	3.0	3.0	7.2	4.5	4.4	4.1	3.0	3.0	4.5
Galactose	1.6	2.2	1.8	—	1.2	2.1	1.6	—	1.2	1.2	1.2	2.0	1.4	—
N-Acetylglucosamine	3.1	4.7	3.0	2.0	3.5	4.8	3.6	2.0	3.1	3.1	3.1	4.5	3.7	2.0
N-Acetylneuraminic acid	0.78	1.3	1.0	—	0.47	1.0	0.5	—	0.51	0.61	0.64	0.85	0.50	—

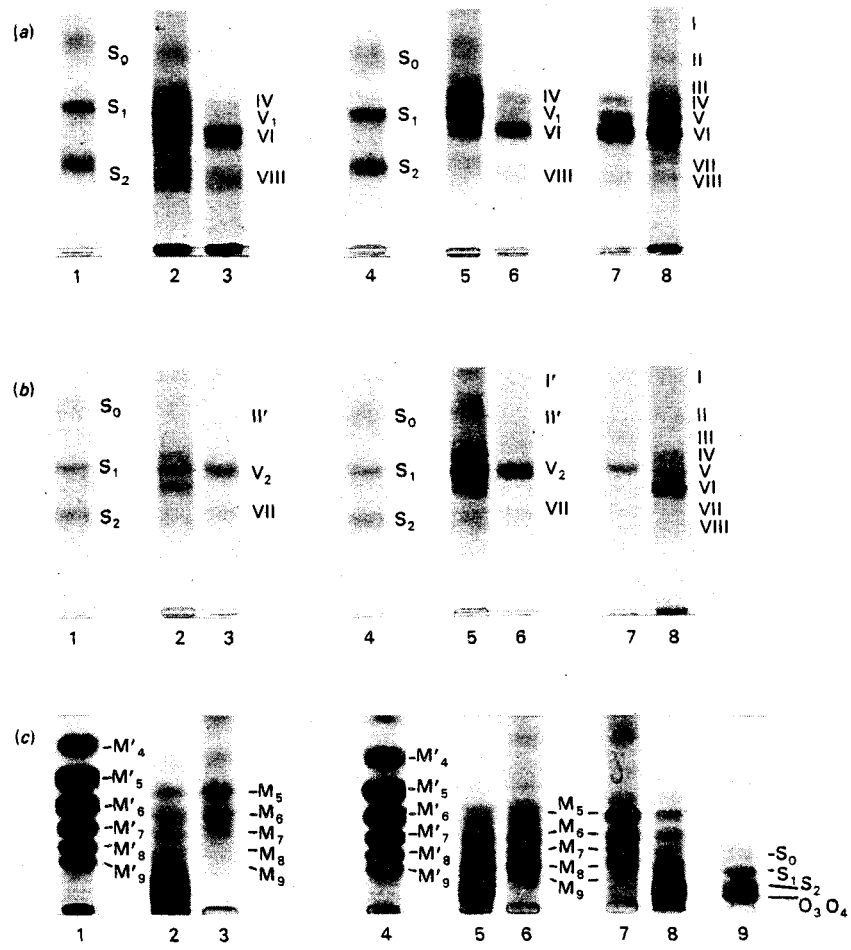


Fig. 3. *T.l.c. of fractions A, B and C obtained by affinity chromatography on immobilized concanavalin A of oligosaccharides liberated by hydrazinolysis of normal and pathological IgM species*

For full experimental details see the text. (*a*) T.l.c. of fraction A in solvent system F. Slots 1 and 4, standards of asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin; slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction A obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7). (*b*) T.l.c. of fraction B in solvent system F. Slots 1 and 4, standards of asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin; slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction B obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7). (*c*) T.l.c. of fraction C in solvent system S. Slots 1 and 4, standards of urinary oligomannosides (M'_4–M'_9); slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis (M_5–M_9) from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction C obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7) (the bands that migrate above M_5 have been identified as heavy contaminants of methyl α-D-glucoside); slot 9, reference oligosaccharides having a slight migration in this solvent system, i.e. asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin, and asialo tri-antennary (O_3) and asialo tetra-antennary (O_4) glycans from α_1-acid glycoprotein. N.B. Bands V_1 and V_2 migrated as compound V but exhibited different affinities for concanavalin A; bands I and II contained a mixture of both *N*-acetyl-lactosaminic and oligomannosidic structures because the components were not fractionated on concanavalin A, whereas bands I' and II' were exclusively of the bi-antennary type. With regard to the oligomannosidic glycans, M'_4–M'_9 designated pathological urinary oligosaccharides lacking one *N*-acetylglucosamine residue and M_5–M_9 designated hydrazinolysate complete oligosaccharides.

All these glycans were expected to contain more than two antennae. With fraction B (Fig. 3*b*), the chromatographic behaviour of its oligosaccharides, which were assumed to be bi-antennary, could be compared with that of serum transferrin glycans (oligosaccharides S_0, S_1 and S_2). Four bands, numbered I′, II′, V_2 and VII, were observed for pathological IgM species, band I′ being absent from the normal IgM pattern. Compound V_2 was predominant in all the IgM species and possessed the same t.l.c. mobility as monosialylated and bi-antennary standard oligosaccharide S_1. Bands I′ and II′ migrated in the same zone as oligosaccharide S_0, which is the bi-antennary oligosaccharide with the highest mobility because it is desialylated. Migration of band VII was compared with that of disialylated reference oligosaccharide S_2. Fraction C (Fig. 3*c*) gave rise to numerous oligosaccharides, which were predicted to be of the oligomannosidic type in view of their strong affinity for concanavalin A–Sepharose. These oligosaccharides were analysed by t.l.c. with solvent S. In this solvent, *N*-acetyl-lactosaminic glycans are known to migrate poorly and they stayed (slot 9) near to the origin. It could be verified for the three samples of fraction C studied that there were no such structures left after fractionation by affinity chromatography (slots 3, 6 and 7) by comparison with the corresponding whole range of oligosaccharides before fractionation (slots 2, 5 and 8). The chromatographic mobilities of these high-mannose units were checked with appropriate standards, i.e. urinary oligomannosides (see Table 1). It should be noted that, because of their origin, these reference compounds lack one *N*-acetylglucosamine residue at the reducing end, and consequently exhibited a slightly higher mobility than the corresponding oligosaccharides possessing the additional *N*-acetylglucosamine residue. We have estimated this difference in migration by comparing the behaviour of such pathological IgM oligosaccharides with that of bovine lactotransferrin oligomannosides obtained after hydrazinolysis (Van Halbeck *et al.*, 1981) in the same t.l.c. system. It was approximately equivalent to the effect of the loss of one mannose residue of the largest oligomannosidic structure, with a progressive enhancement in the upper region of the plate. Taking this rule into account, we were able to identify the bands numbered M_5–M_9 as oligosaccharides containing five to nine mannose residues respectively; there was a predominance of larger oligomannosides for pathological IgM-7 and a predominance of smaller oligomannosides for normal IgM and pathological IgM-10.

Further structural investigation was performed on *N*-acetyl-lactosaminic units by eliminating the heterogeneity due to the presence of *N*-acetylneuraminic acid residues and by then making a provisional identification of the structures of the residual oligosaccharides. Desialylation with trifluoroacetic acid was performed on fractions A and B for each IgM sample, and t.l.c. migration of their asialoglycans was compared with that of neutral reference oligosaccharides (Fig. 4). On such treatment of fraction A it was found that all the oligosaccharides obtained migrated more slowly than did the neutral bi-antennary standard oligosaccharide S_0. The major compound obtained (X_2) had the same chromatographic behaviour as the fucosylated asialo triantennary glycan of orosomucoid (oligosaccharide O_3F) and as oligosaccharide IV (Fig. 3*a*). As visualized for pathological IgM-10 (slot 3), the compound X_1, which migrated between oligosaccharides O_3 and S_0, was smaller than oligosaccharide O_3, and the oligosaccharide X_3, which migrated the same distance as did oligosaccharide O_4, was presumed to be a tetra-antennary unit. On desialylation of fraction B, as expected, all structures were converted into glycans that migrated in the same zone as oligosaccharide S_0 (zone X_4–X_5). From these results it can be concluded that fraction A is chiefly composed of tri-antennary oligosaccharides accompanied by a smaller amount of tetra-antennary ones, and that fraction B is essentially constituted of bi-antennary oligosaccharides. The oligosaccharides derived from pathological IgM-10 exhibited the greater heterogeneity of structure.

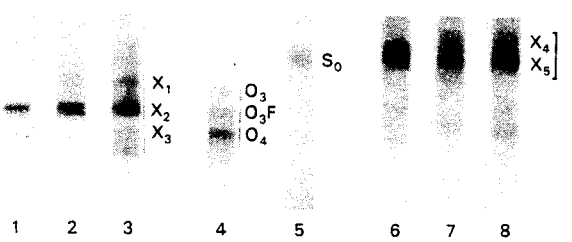


Fig. 4. *T.l.c. of oligosaccharides of desialylated fractions A and B*

For experimental details see the text. Solvent system F was used. Slots 1, 2 and 3, asialo-glycans from fraction A from normal IgM (slot 1), from pathological IgM-7 (slot 2) and from pathological IgM-10 (slot 3); slots 4 and 5, reference oligosaccharides from α_1-acid glycoprotein [asialo triantennary (O_3 and O_3F) and asialo tetra-antennary (O_4) glycans] (slot 4) and from serum transferrin [asialo bi-antennary glycan (S_0) (slot 5); slots 6–8, asialoglycans from fraction B from normal IgM (slot 6), from pathological IgM-7 (slot 7) and from pathological IgM-10 (slot 8).

Discussion

In the present study, by using reproducible and sensitive methodology, a comparison between the numerous glycans present in various IgM species was possible in spite of their well-known heterogeneity.

The application of these rapid procedures to small quantities of native immunoglobulins indicates the coexistence of both *N*-acetyl-lactosaminic type and oligomannosidic type of structures for each IgM population studied, suggesting that oligomannosides are not a typical feature of pathological IgM molecules, as has been suggested (Jouanneau *et al.*, 1981). T.l.c. allows the identification of at least 13 migrating oligosaccharides for each IgM treated, in agreement with the structural heterogeneity previously reported by Chapman & Kornfeld (1979*a*,*b*). According to those authors, all high-mannose intermediate oligosaccharides seem to be present as revealed by t.l.c. in solvent S (see Fig. 3*c*). However, further structural investigations are needed to verify the identity of such structures.

In the present work affinity chromatography on concanavalin A–Sepharose was introduced as an extremely useful tool for the fractionation of glycans from the complex mixtures and for the determination of their respective distribution in IgM families (Table 2). Qualitatively and quantitatively polyclonal IgM species show an intermediate behaviour, presumably reflecting a statistical cellular production of a balanced range of oligosaccharide units. This approach was used as the basis for interpretation of the distribution patterns of oligosaccharides obtained from pathological IgM families. In this regard, monoclonal IgM-7 exhibits a predominance of smaller oligosaccharides, whereas IgM-10 appears to be enriched in complex glycans.

From consideration of both the origin of the IgM studied and previously published data on the biosynthesis of oligosaccharide units (Kornfeld *et al.*, 1978; Li *et al.*, 1978; Tabas *et al.*, 1978; Tabas & Kornfeld, 1978; Parodi & Leloir, 1979), a possible interpretation of the differences observed can be proposed. Normal IgM species reflect their polyclonal origin and can be considered as a statistical population, whereas a monoclonal IgM appears as the expression of one single immunoglobulin-producing cell activity among the multipotentiality due to the diversity of cells. Since it is firmly established that oligomannosidic units serve as intermediates in the biosynthesis of *N*-acetyl-lactosaminic glycans, it can be postulated that the extent of processing of high-mannose oligosaccharides along the pathway towards the formation of complex oligosaccharides is different within each IgM population. On taking the polyclonal IgM glycans as a standard for comparison, results for monoclonal IgM-10 suggest an 'over-processing' leading to a higher production of more complex units, whereas a smaller degree of elaboration of the oligosaccharide chains seems to occur for monoclonal IgM-7. This might be due to altered activity either of the *N*-acetylglucosaminyltransferase, responsible for the substitution of one mannose residue on the core pentasaccharide, or of the α-mannosidase.

The most probable interpretation of the differences observed between normal and pathological IgM species is that regulating factors are involved in the sequence of the metabolic events (i.e. mannose removal and addition of the outer residues) leading to the biosynthesis of glycans. One could imagine that in pathological cases (e.g. in the present case of Waldenström's macroglobulinaemia) such control mechanisms are altered. The factors implicated remain to be determined.

In conclusion, in the field of investigations of structure–function relationships, the information available on the structures of glycans still does not allow an elucidation of their biological role; nevertheless, as in the present study, by comparing the structures of normal and pathological IgM species it is possible to make an approach towards an understanding of the mechanisms involved in their metabolism.

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) (Laboratoire Associé no. 217: Relations Structure–Fonction des Constituants Membranaires; Equipe de Recherche Associée no. 070696: Immunochimie et Biologie Moléculaire), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Unité de Recherches no. 202: Immunochimie et Biologie Moléculaire) and by the Fondation pour la Recherche Médicale. We are very much obliged to Professor G. Spik, Professor B. Fournet and Dr. G. Strecker for their generous supply of standards for t.l.c. We are also grateful to Y. Leroy and J. F. Massias for their skilful assistance.

References

Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) in *Methodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués* (Montreuil, J., ed.), pp. 209–218, Éditions du C.N.R.S., Paris

Bayard, B., Kerckaert, J. P., Roux, D. & Strecker, G. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.* **27**, 153–156

Cahour, A., Ollier-Hartmann, M. P., Mihaesco, C. & Hartmann, L. (1981) *Biomedicine* **35**, 133–136

Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979*a*) *J. Biol. Chem.* **254**, 816–823

Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979*b*) *J. Biol. Chem.* **254**, 824–828

Clamp, J. R. & Johnson, I. (1972) in *Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function*, 2nd edn. (Gottschalk, A. J., ed.), pp. 612–652, Elsevier, Amsterdam

Debray, H. & Montreuil J. (1978) *Biochimie* **60**, 697–704
Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegenthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry* **17**, 5206–5214
Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C. K. & Kornfeld, S. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2156–2163
Jouanneau, J., Rasafimahaleo, E. & Bourrillon, R. (1970) *Eur. J. Biochem.* **17**, 72–77
Jouanneau, J., Fournet, B. & Bourrillon, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **667**, 277–284
Kornfeld, S., Li, E. & Tabas, J. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7761–7778
Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7762–7770
Montreuil, J. (1982) *Compr. Biochem.* **19B**, part II, 1–188
Narasimhan, S., Wilson, J. R., Martin, E. & Schachter, H. (1979) *Can. J. Biochem.* **57**, 83–96
Palo, J. & Savolainen, H. (1972) *J. Chromatogr.* **65**, 447–450
Parodi, A. P. & Leloir, L. F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 1–37
Reading, C. L., Penhoet, E. & Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5600–5616
Shimizu, A., Putnam, F. W., Paul, C., Clamp, J. R. & Johnson, I. (1971) *Nature (London) New Biol.* **213**, 73–76
Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* **50**, 296–299
Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie* **58**, 579–586
Tabas, J. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7779–7786
Tabas, J., Schlesinger, S. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 716–722
Takasaki, S. & Kobata, A. (1978) *Methods Enzymol.* **50**, 50–54
Van Halbeck, H., Dorland, L., Vliegenthart, J. F. G., Spik, G., Cheron, A. & Montreuil, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 293–296
Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* **69**, 291–304

La première étape du fractionnement des chaînes glycanniques révèlait une grande hétérogénéité de leurs structures puisque nous avons pu dénombrer un minimum de 13 glycannes par famille d'IgM, d'après les résultats issus des séparations par chromatographie sur Con A-Sepharose 4B et T.L.C. (voir Figure 2 et 3 ; p. 127 et p. 129). Afin d'établir les structures primaires des oligosaccharides des différentes IgM, nous nous sommes attaché à les purifier par électrophorèse à haut voltage sur papier et chromatographie liquide haute pression (se reporter au chapitre Matériel et Méthodes ; p. 61). Ces travaux ont conduit à la détermination des structures primaires des principaux glycannes d'IgM normales et pathologiques qui sont représentées dans la Figure 14 (p. 134) et qui ont fait l'objet des publications 6 et 7 mentionnées aux pages 3 et 4. Nous nous limiterons à un bref exposé des principaux résultats.

Les différences observées entre les IgM normales et pathologiques étaient essentiellement quantitatives. En effet, quelle que soit l'IgM, on retrouvait :

1 - des glycannes oligomannosidiques comportant de 5 à 9 résidus de mannose. Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs consacrés aux IgM de Waldenström (CHAPMAN et KORNFELD -349-, COHEN et BALLOU -350-, JOUANNEAU et al. -351-). La présence de ces structures dans les IgM normales montre qu'elles ne sont pas associées au caractère pathologique de la molécule comme l'avaient proposé JOUANNEAU et al. (-352-). D'autre part, nous n'avons pas retrouvé le glycanne GlcNAc Man_5 $GlcNAc_2$ mentionné par CHAPMAN et KORNFELD (-353-) ;

2 - des structures de type N-acétyllactosaminique biantennées dont nous avons déterminé les structures primaires des composés majeurs :

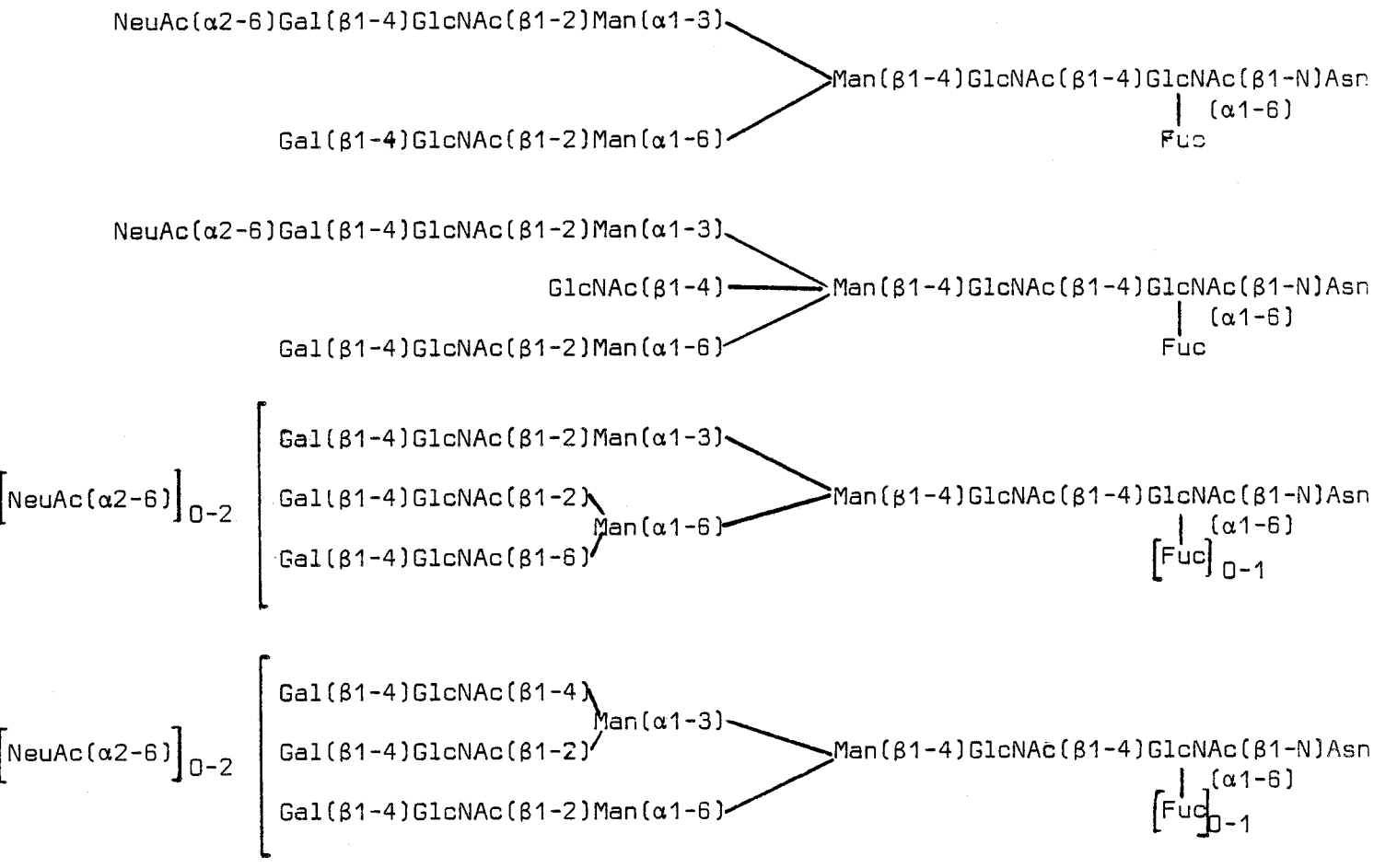


Figure 14 - Structures primaires de glycannes de type N-acétyllactosaminique d' IgM de macroglobulinémie de Waldenström.

BU LILLE

- un glycanne monosialylé, fucosylé sur la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine (voir Figure 14 ; p. 134) que l'on retrouvait majoritairement dans les IgM normales (21,6 %) ainsi que dans les IgM-7 (25 %). Ce glycanne a été décrit par HICKMAN et al. (-354-) dans une IgM humaine ;

- un glycanne monosialylé, fucosylé sur la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine, possédant une N-acétylglucosamine intercalaire (voir Figure 14 ; p.134), majoritaire dans l'IgM-10 (36,4 %). Ce type de glycanne n'avait jamais été décrit dans les IgM, mais on le retrouve dans d'autres immunoglobulines (PIERCE-CRETEL et al. -355-, MELLIS et BAEZINGER -356-) ;

- des glycannes mineurs de type N-acétyllactosaminique, triantennées, (voir Figure 14 ; p.134). De tels glycannes ont été décrits dans des IgM myélomateuses de Souris (BRENCLE et KORNFELD -357-).

Les travaux que nous avons menés ne nous ont pas permis de dégager un marqueur glycannique de la macroglobulinémie de Waldenström, les différences observées étant restées d'ordre quantitatif. L'explication de ce phénomène reste actuellement obscure et la seule hypothèse que nous puissions formuler repose sur l'existence de mécanismes défectueux de régulation de la biosynthèse des glycannes. Dans la suite de nos recherches, nous nous sommes attaché à étudier la structure des glycannes de fibroblastes transformés viralement. L'objectif était le même que précédemment : existait-il des structures glycanniques nouvelles apparaissant lors de la transformation maligne des cellules ?

ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE DE FIBROBLASTES DE HAMSTER NORMAUX ET TRANSFORMES

Ces travaux s'inscrivent dans un programme de recherches, menées au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, sur les modifications des structures glycanniques accompagnant la transformation maligne des cellules. Les résultats de ces études entreprises en collaboration avec Messieurs Henri DEBRAY et Philippe DELANNOY (U.S.T. Lille I), ont fait l'objet de plusieurs communications (voir p.5) et peuvent se résumer de la manière suivante.

Le choix des modèles cellulaires s'est porté sur le fibroblaste de rein de Hamster (cellule BHK21/C_{13}) ou le fibroblaste embryonnaire de Hamster (cellule E.H.) comme cellules "normales" de référence et sur le fibroblaste de rein de Hamster transformé par le virus du sarcome du Hamster (cellule BHK-HSV) comme cellule transformée. La méthodologie suivie, fondée sur la comparaison de profils chromatographiques (chromatographies de gel filtration sur Ultrogel ACA 202, d'affinité sur ConA-Sepharose et Lens culinaris agglutinin-Sepharose) des glycopeptides pronasiques cellulaires marqués métaboliquement, nous a permis de montrer que les glycoprotéines membranaires des cellules transformées étaient enrichies en glycannes tri- et tétraantennés, ces résultats étant en accord avec ceux des équipes de WARREN et de VAN BEEK (voir, p.53).

En outre, après hydrazinolyse des différentes familles de glycopeptides, N-réacétylation des glycannes ainsi libérés, puis séparation en fonction de leurs charges par H.P.L.C. (voir le chapitre Matériel et Méthodes, p. 61), nous avons constaté que, d'une part, l'augmentation de taille des glycopeptides des cellules transformées était attribuable non seulement à une multiantennarisation mais aussi à une hypersialylation, et que, d'autre part, les différences observées étaient d'ordre quantitatif et non qualitatif. Ces résultats étaient en accord avec ceux de BLITHE et al. (-358-) et en désaccord avec ceux de

TAKASAKI et al. (-359-) puisque ces derniers avaient trouvé de nouvelles structures glycanniques (penta- et hexaantennées) dans les glycoprotéines des cellules transformées (voir p.54).

Notre travail personnel s'est orienté plus spécifiquement vers la comparaison des glycannes de type oligomannosidique des cellules normales et transformées. Bien que cette classe de glycannes représente de 20 à 40 % des glycannes cellulaires totaux de type N-glycosidique, peu d'études lui ont été consacrées et ne permettent pas une quantification précise des différentes structures oligomannosidiques. Tout au plus ressort-il de ces travaux que les membranes de cellules transformées ou en croissance sont plus riches en glycannes oligomannosidiques les plus "lourds". Hors, ces oligosaccharides jouent un rôle fondamental dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (GRABEL et al -360-). En particulier, RAUVALA et HAKOMORI (-361-) ont montré qu'ils intervenaient dans l'adhésion de fibroblastes de Hamster par interaction entre les glycannes oligomannosidiques d'une cellule et une α-mannosidase de surface d'une autre cellule.

Le but que nous nous étions fixé était de comparer les glycannes oligomannosidiques de cellules normales et transformées afin de répondre aux questions suivantes : existe t-il des différences et, dans l'affirmative, sont-elles qualitatives ou quantitatives ?

I - MATERIEL ET METHODES.

Ce chapitre rappelle brièvement les techniques spécifiques que nous avons utilisées lors de cette étude.

A - MATERIEL

Les monosaccharides radioactifs : D - 1 -[^{14}C] glucosamine, D - 6-[^{3}H] glucosamine et D - 2 -[^{3}H] mannose proviennent de la firme Amersham, le support d'affinité ConA - Sepharose 4B de la firme Pharmacia, la Pronase de Calbiochem (U.S.A.), l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H de Streptomyces plicatus de Miles (U.S.A.). L'α-mannosidase de la fève Jack est un don du Professeur S. BOUQUELET (U.S.T. Lille I), tandis que les oligosaccharides oligomannosidiques témoins Man_5 GlcNAc à Man_9 GlcNAc, ainsi que le disaccharide Man(ß1-4)GlcNAc ont été fournis par le Docteur G. STRECKER (U.S.T. Lille I).

B - METHODES

1 - Conditions de culture cellulaire et de marquage métabolique.

Nous avons utilisé dans cette étude comme cellule de référence le fibroblaste embryonnaire de Hamster (cellule E.H.) ou le fibroblaste de rein de Hamster (cellule BHK21/C_{13}) et comme cellule transformée le fibroblaste de rein de Hamster transformé par le virus du sarcome de Hamster (cellule BHK-HSV). Nous remercions le Professeur L. MONTAGNIER de l'Institut Pasteur de Paris qui nous a fourni ces souches cellulaires.

Ces cellules sont maintenues en culture dans le milieu minimum de Eagle complété par : $NaHCO_3$,33mM ; L-glutamine, 2mM ; bactotryptose, 0,3 % ; auréomycine, 5 mg/ml ; fungizone, 25 mg/ml ; 10 % de sérum de Veau nouveau-né.

Les marquages métaboliques sont effectués par addition dans le milieu de culture, au moment du repiquage, de 125 µCi pour les cellules E.H. et pour les cellules BHK21/C_{13} de D - 6-[^{3}H] glucosamine (activité spécifique 30 Ci/mM) et de 25 µCi de D - 1-[^{14}C] glucosamine (activité spécifique 55 mCi/mM) pour les cellules BHK-HSV. Les marquages métaboliques par le D - 2-[^{3}H] mannose sont effectués par addition au milieu de culture de 125 µCi pour les cellules E.H. et BHK-HSV.

Ces cellules sont cultivées en présence du précurseur radioactif pendant 48 à 72 h afin d'obtenir une culture de cellules confluentes.

2 - Préparation des glycopeptides oligomannosidiques.

a - Préparation des glycopeptides cellulaires totaux.

Après délipidation selon le protocole de CACAN et al. (-362-), les protéines cellulaires sont digérées par la pronase selon la méthode de MURAMATSU et al. (-363-), dans le tampon Tris/HCl 0,14 M pH 8,4 ; CaCl2, 14mM, additionné de pronase. L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 72 h sous légère agitation, la pronase étant ajoutée après 24 h et 48 h d'incubation. Après hydrolyse, l'excés de pronase est dénaturé par chauffage 2 min à 100°C et les échantillons glycopeptidiques sont purifiés sur une colonne de Biogel P2 équilibrée dans l'eau.

A ce niveau, les glycopeptides marqués par la D - 6-[^{3}H] glucosamine (cellules normales) et la D - 1-[^{14}C] glucosamine (cellules tranformées) sont rassemblés et toutes les étapes suivantes sont

réalisées sur le mélange, la mesure de la radioactivité étant effectuée par comptage en double marquage dans un compteur à scintillation liquide Beckman LS 9000.

b - Séparation des glycopeptides cellulaires totaux.

Les glycopeptides sont fractionnés en fonction de leur affinité vis-à-vis de la ConA -Sepharose 4B (se reporter au chapitre Matériel et Méthodes p.65). Les différents pics d'élution obtenus sont dessalés sur Biogel P2 équilibré dans l'eau.

3 - Préparation des oligosaccharides de type oligomannosidique.

Les fractions éluées par l'α-Me.Glc 0.3 M (FEC 0,3 M) sont lyophilisées, puis reprises par du tampon citrate/phosphate 0,075 M, pH 5,5, additionné de 5 mU.I. d'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H. L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 48 h, 5 mU.I. d'endoglycosidase H étant ajoutées après 24 h d'incubation. Après hydrolyse, l'excés d'enzyme est dénaturé par chauffage 2 min à 100°C et les oligosaccharides sont purifiés soit :

- par passage sur une colonne de résine AG 1-X2 ($HCOO^-$), 200-400 mesh, équilibrée dans l'eau, et ne sont pas, dans ce cas, retenus sur cette résine ;

- ou par passage sur une colonne de ConA - Sepharose 4B et dans ce cas sont, élués par l'α-Me.Glc 0,3 M. Ils sont ensuite dessalés sur une colonne de Biogel P2 équilibrée dans l'eau, puis lyophilisés en vue des séparations ultérieures.

4 - Fractionnement des oligosaccharides de type oligommanosidique.

Les oligosaccharides libérés par l'endo N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H sont fractionnés par chromatographie sur papier ou par H.P.L.C. sur une colonne 5 µm Amino AS-5a (voir le chapitre Matériel et Méthodes p.61).

5 - Digestion des oligosaccharides de type oligomannosidique par l'α-mannosidase de la fève Jack.

Les glycannes oligomannosidiques marqués par le D - 2-[^{3}H] mannose et séparés par H.P.L.C. ont été réduits par le borohydrure de sodium, déssalés sur Biogel P2 équilibrée dans l'eau et digérés par l'α-mannosidase de la fève Jack dans un tampon acétate de sodium 0,IM, pH 5,0 à 37°C, pendant 96 h en présence d'une goutte de toluène (2 additions successives d'enzyme à 48 h d'intervalle, concentration finale en enzyme 15 U/ml). Après hydrolyse, l'excés d'enzyme est dénaturé par chauffage 2 min à 100°C et les produits de la réaction sont dessalés sur Dowex 50 x 8 (H^+)et 1 x 8 (OH^-) avant d'être analysés par T.L.C. dans le solvant II (voir p.66). Après séchage, des bandes de 1 x 0,5 cm de silice sont récupérées par grattage et comptées en scintillation liquide en présence de 0,5 ml d'eau.

II - RESULTATS ET DISCUSSIONS

A - FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES MARQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D 'AFFINITE SUR CONA - SEPHAROSE 4B.

Les glycopeptides pronasiques isolés des cellules normales et transformées ont été fractionnés sur colonne de ConA - Sepharose 4B, par co-chromatographie dans le cas des glycopeptides marqués métaboliquement par la glucosamine (^{3}H pour les cellules E.H. et BHK21/C_{13} ; ^{14}C pour les cellules BHK-HSV) et séparément dans le cas des glycopeptides marqués par le D- 2-[^{3}H] mannose. La spécificité de cette lectine (DEBRAY et MONTREUIL -364-) nous a permis d'obtenir quatre fractions glycopeptidiques distinctes (voir p.65). La Figure 15 (p.143) nous donne un exemple de ce type de fractionnement (séparation de glycopeptides marqués au D- 2-[^{3}H] mannose issus des cellules transformées) et le tableau VIII (p.144) les valeurs des fractions éluées par l'α-Me.Glc 0,3 M, exprimées en pourcentage de la radioactivité totale incorporée par les glycopeptides des cellules normales et transformées. Nous pouvons remarquer que, selon le type de marquage métabolique (glucosamine ou mannose) et pour des cellules identiques, les pourcentages de ces fractions présentent des différences importantes (par exemple 12,2 % du marquage glucosamine et 53 % du marquage mannose pour les cellules BHK-HSV). Ceci est dû au fait que ces valeurs sont surestimées dans le cas d'un marquage par le mannose, puisque les glycopeptides de type oligomannosidique contiennent jusqu'à 9 résidus de mannose alors que les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique n'en comportent que 3. A l'inverse, lors d'un marquage par la glucosamine, ces mêmes glycopeptides de type oligomannosidique ne contenant que 2 glucosamines sont sous-estimés par rapport aux glycopeptides de type N-acétyllactosaminique. Et ce n'est que dans le cas d'un marquage par le mannose, et à condition de

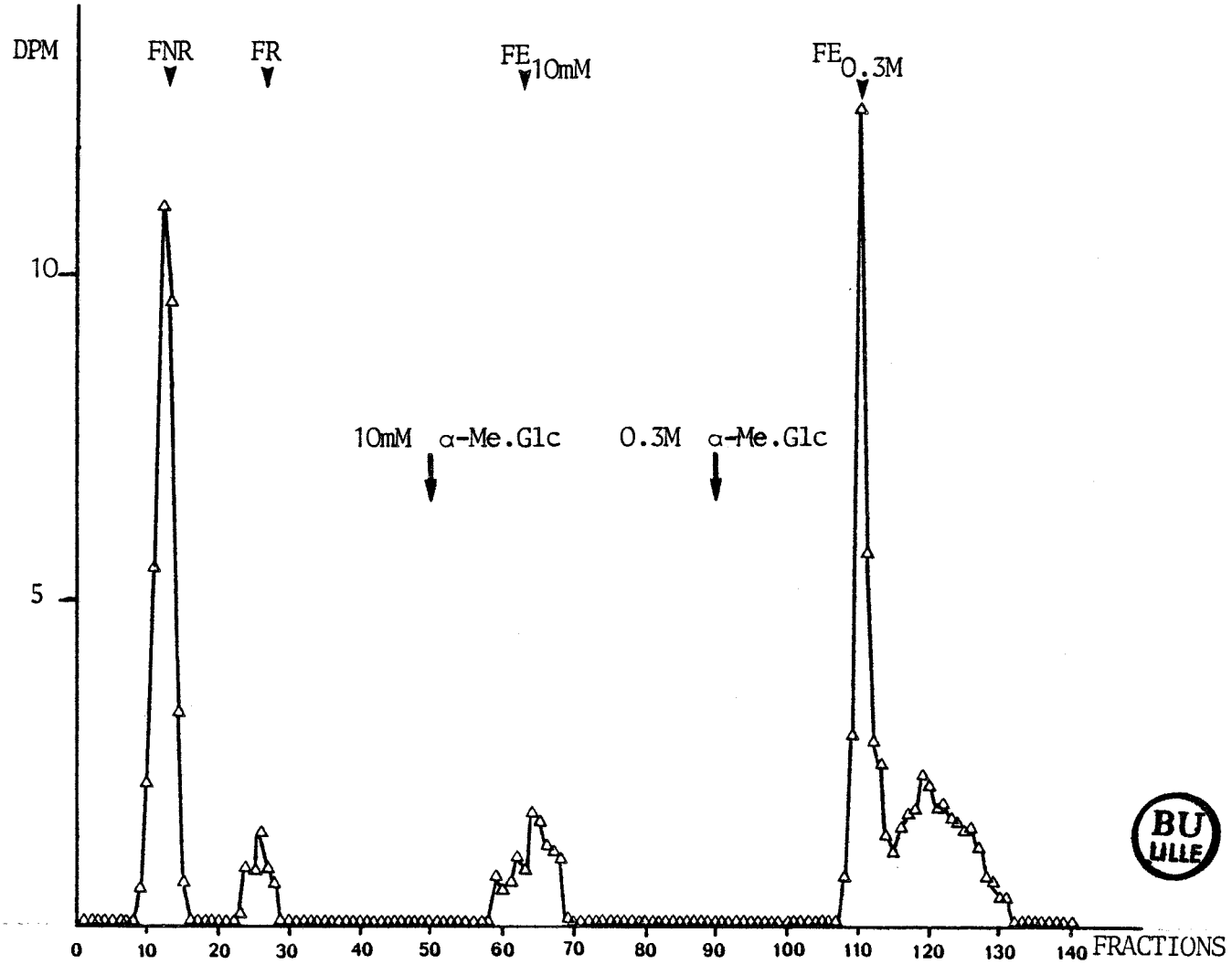


Figure 15 - Chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-Sepharose 4B de glycopeptides de cellules transformées (BHK-HSV) marqués par le D- 2-[^{3}H] mannose (pour les détails expérimentaux, se reporter au paragraphe: Matériel et Méthodes,p.61).

TABLEAU VIII - Pourcentage de la radioactivité totale des fractions éluées par l'α-Me.Glc 0,3M de la colonne de Con A - Sepharose 4B, issues des glycopeptides totaux de cellules normales et transformées marqués par la glucosamine ou par le mannose. (Pour les détails expérimentaux se reporter au paragraphe Matériel et Méthodes).

CELLULES	Fraction éluée par l'α-Me.Glc 0,3 M
Cellule E.H. ($GlcNH_2$ ^3H) %	9,1
Cellule BHK 21/ C_{13} ($GlcNH_2$ ^3H) %	10,5
Cellule BHK - HSV ($GlcNH_2$ ^{14}C) %	12,2
Cellule E.H. (D - 2 - ^3H Man) %	43
Cellule BHK - HSV (D - 2 - ^3H Man) %	53

TABLEAU IX - Pourcentages de la radioactivité des 5 fractions oligomannosidiques séparées par chromatographie sur papier ou par H.P.L.C.. (Pour les détails expérimentaux se reporter au paragraphe Matériel et Méthodes).

CELLULES	$Man_5GlcNAc$	$Man_6GlcNAc$	$Man_7GlcNAc$	$Man_8GlcNAc$	$Man_9GlcNAc$
E.H. %	21,3	22,1	15,4	19,2	22,0
BHK 21/C_{13} %	25,7	28,2	11,0	18,1	17,0
BHK - HSV %	13,0	28,1	17,9	20,1	20,7

BU LILLE

connaître les pourcentages de chaque classe de glycannes oligomannosidiques, que l'on pourra corriger ces valeurs et évaluer la représentativité de chaque type de glycanne.

Il apparaît néanmoins à la vue des résultats donnés par le Tableau VIII (p.144) une légère augmentation (environ 20 %) du taux des structures oligomannosidiques dans les cellules transformées.

B - FRACTIONNEMENT DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE LIBERES PAR L'ENDO-N-ACETYL-ß-D-GLUCOSAMINIDASE H

1 - Glycopeptides marqués sur la glucosamine.

a - Libération des glycannes par l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H.

Les glycopeptides isolés des cellules normales et transformées et élués de la colonne de ConA-Sepharose 4B par l'α-Me.Glc 0,3 M ont été digérés par l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H. Il s'agissait pour ce type de marquage de co-fractionnement associant des glycopeptides ^{3}H de cellules normales et ^{14}C de cellules transformées (E.H/BHK-HSV et BHK 21-C_{13}/BHK-HSV).

Cet endo-enzyme hydrolyse la liaison GlcNAc (ß1-4) GlcNAc du noyau pentasaccharidique des glycannes, en libérant une partie glycannique possédant un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice et l'autre résidu de N-acétylglucosamine lié à l'asparagine de la chaîne protéique. Nous avons, en effet, retrouvé, quel que soit le type cellulaire, environ 50 % du marquage des glycopeptides dans les oligosaccharides après l'hydrolyse enzymatique, cette dernière se révélant donc complète dans nos conditions expérimentales. Les autres 50 % ont été essentiellement retrouvé dans un composé migrant en T.L.C. comme le chaînon GlcNAc (ß1-N)Asn.

En fonction des spécificités étroites de la ConA et de l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H, nous pouvions déjà escompter retrouver dans ces fractions, des glycannes de type oligomannosidique possédant au moins 5 mannoses et/ou des glycannes de type mixte.

b - Séparation des glycannes oligomannosidiques.

Les glycannes oligomannosidiques libérés par l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H ont été co-fractionnés par chromatographie sur papier ou par chromatographie liquide haute performance sur colonne Amino AS-5A, 5µm, cette dernière méthode se révèlant posséder la meilleure résolution. 5 familles de glycannes ont été obtenues qui possédaient des comportements chromatographiques identiques aux oligosaccharides témoins $Man_5GlcNAc$, $Man_6GlcNAc$, $Man_7GlcNAc$, $Man_8GlcNAc$ et $Man_9GlcNAc$, quel que soit le type de cellule. Le Tableau IX (p.144) nous donne le pourcentage de la radioactivité totale de chacune de ces fractions et l'on peut noter que la différence majeure dans la répartition de ces glycannes réside dans le faible pourcentage de la structure $Man_5GlcNAc$ dans les cellules transformées. Néanmoins, par cette méthode de marquage il n'est pas possible de quantifier chaque type de glycanne oligomannosidique et l'augmentation des structures oligomannosidiques les plus lourdes dans les cellules transformées n'apparaît pas dans le Tableau IX. Pour ces raisons, nous avons orienté nos recherches vers l'étude de ces glycannes marqués par le D - 2-[^{3}H] mannose.

2 - Glycopeptides marqués par le D - 2-[^{3}H] mannose.

a - Séparation des glycannes de type oligomannosidique libérés par l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H.

L'isotope du marquage métabolique étant identique pour les cellules normales et transformées, toutes les étapes de fractionnement se réalisèrent séparément. Après hydrolyse enzymatique, les glycannes oligomannosidiques ont été séparés par H.P.L.C. comme précédemment. Un exemple de séparation est donné dans la Figure 16 (p.148) où nous retrouvons les 5 classes de glycannes ($Man_5GlcNAc$ à $Man_9GlcNAc$).

Grâce à ce mode de marquage, il nous est possible de corriger les valeurs brutes des pourcentages de la radioactivité totale des glycopeptides : les glycannes non retenus sur la colonne de ConA-Sépharose 4B ou élués par l'α-Me.Glc 10mM ne contiennent que 3 mannoses appartenant au motif pentasaccharidique commun. Les glycannes élués par l'α-Me.Glc 0,3 M possèdent un pourcentage surestimé par rapport aux glycannes précédents et il faut procéder aux corrections suivantes.
Sachant que 100 % = % $FEC_{0,3\ M}$ + (% FEC_{10mM} + % FNR) et connaissant les pourcentages (a, b, c, d, e) des glycannes ($Man_5GlcNAc$ à Man_9 GlcNAc) de la fraction $FEC_{0,3M}$, séparés par H.P.L.C., pour 3 mannoses, le pourcentage total de la radioactivité deviendra :

$$Y\ \% = \frac{a \times 5 + b \times 6 + c \times 7 + d \times 8 + e \times 9}{3}$$

$$+ \frac{(\%\ FEC_{10mM} + \%\ FNR) \times 3}{3}$$

et les pourcentages corrigés deviendront :

$$100\ \% = \frac{a \times 5 + b \times 6 + c \times 7 + d \times 8 + e \times 9}{3} \times \frac{100}{Y} +$$

$$FE_{10mM} \times \frac{100}{Y} + FNR \times \frac{100}{Y}$$

Un exemple d'application de ce calcul est présenté la Figure 16 (p.148).

Les Tableaux X et XI (p.149) nous donnent les pourcentages comparatifs, avant et après correction, des glycannes marqués sur le mannose des cellules normales et transformés et on retrouve

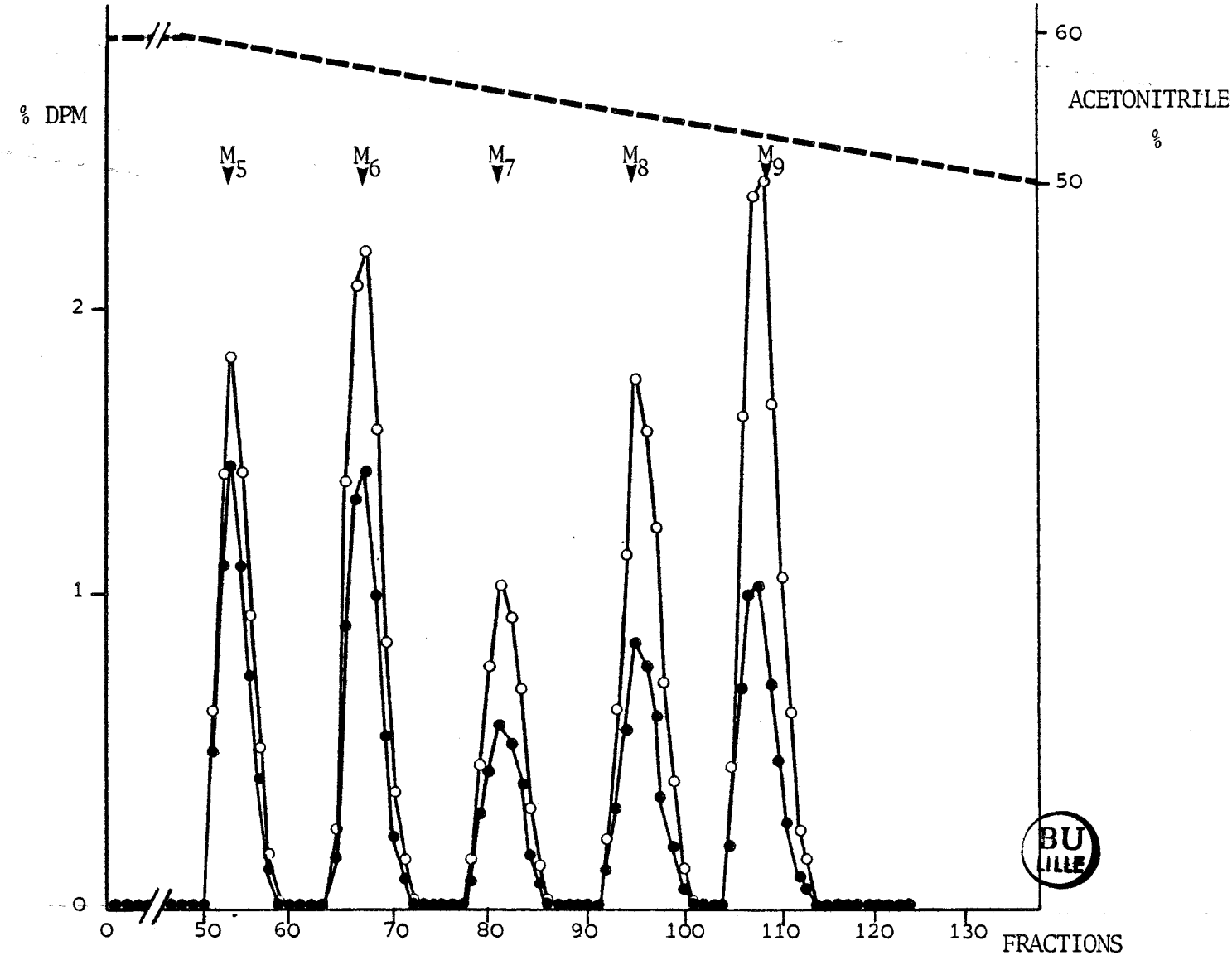


Figure 16- H.P.L.C. des glycannes oligomannosidiques de cellules normales, marqués par le D- 2-[^{3}H] mannose; (O-O-O) : données brutes; (●-●-●) : données corrigées (se reporter au Tableau XI); M_5,M_6,M_7,M_8 et M_9: témoins oligomannosidiques. (Pour les détails expérimentaux se reporter au paragraphe Matériel et Méthodes).

TABLEAU X - Pourcentage de la radioactivité totale des 4 fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de Con A - Sepharose 4 B des glycopeptides marqués au D - 2-[^{3}H] mannose issus de fibroblastes embryonnaires et de fibroblastes transformés.

	Fraction non retenue	Fraction retardée	Fraction éluée par: α-M.Glc 10 mM	Fraction éluée par: α-M.Glc 0.3 M
Fibroblastes embryonnaires %	21,3	3	32,7	43
Fibroblastes transformés %	34	5	11	53

TABLEAU XI - idem au tableau X, mais les pourcentages sont corrigés en fonction de la distribution du marquage dans les structures oligomannosidiques (voir p. 147).

	Fraction non retenue	Fraction retardée	Fraction éluée par: α-M.Glc 10mM	Fraction éluée par: α-M.Glc 0.3 M
Fibroblastes embryonnaires %	28,5	4	43,5	24
Fibroblastes transformés %	45,8	7.1	15,7	31,6

l'augmentation des structures tri- ou tétraantennées et la diminution des structures biantennées dans les cellules transformées tandis que les glycannes oligomannosidiques sont légèrement augmentés (24 %). Une comparaison fine des populations oligomannosidiques des cellules normales et transformées nous est donnée dans la Figure 17 et le Tableau XII (p.151). On peut en déduire que :

1 - les cellules transformées contiennent nettement plus de glycannes oligomannosidiques lourds ($Man_7GlcNAc$, $Man_8GlcNac$ et $Man_9GlcNAc$) que les cellules normales ;

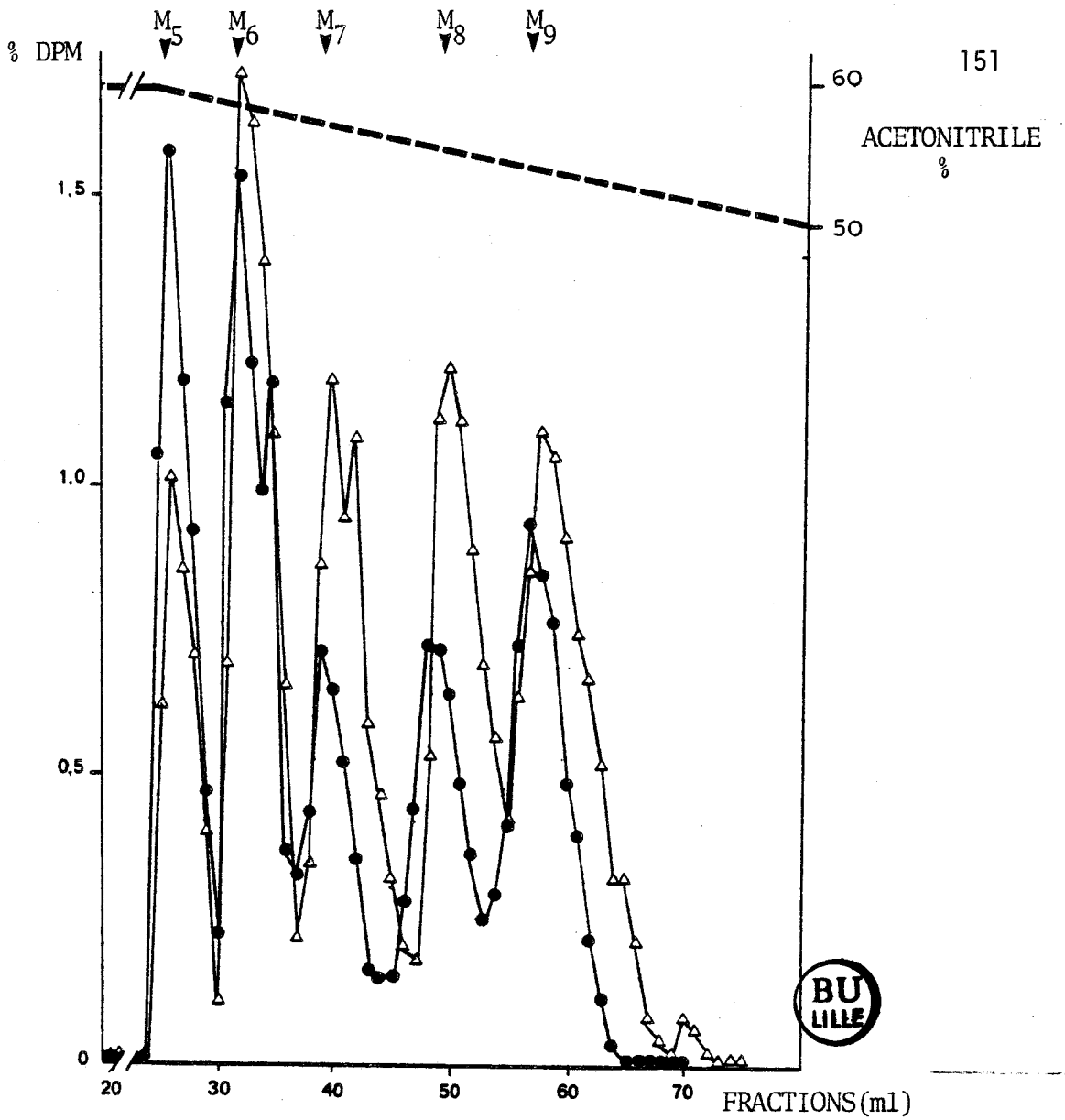
2 - les cellules transformées contiennent moins de $Man_5GlcNAc$ que les cellules normales.

Il faut préciser que ces résultats sont reproductibles puisqu'ils se sont révélés identiques en partant de plusieurs lots de cellules marquées,

Il convenait toutefois de vérifier que l'on était bien en présence de ces types de structures oligomannosidiques puisque nos résultats étaient uniquement fondés sur des comportements chromatographiques identiques à ceux de témoins de structures connues. Nous avons donc entrepris la préparation de ces 5 glycannes issus des cellules normales et transformées, par H.P.L.C. préparative, afin de les soumettre à l'action de l'α-mannosidase de la fève Jack et ainsi vérifier leur nature.

b - Digestion des glycannes oligomannosidiques isolés des cellules normales et transformées par l'α-mannosidase de la fève Jack.

Après séparation par H.P.L.C. préparative, dans des conditions identiques à celles décrites précédemment, les glycannes de type oligomannosidique des cellules normales et transformées ont été



BU LILLE

Figure 17 - H.P.L.C. des glycannes oligomannosidiques marqués par le D- 2-[^{3}H] mannose; (●-●-●) : cellules normales, (△-△-△) : cellules transformées; M_5, M_6, M_7, M_8 et M_9 : témoins oligomannosidiques. (Pour les détails expérimentaux, se reporter au paragraphe Matériels et Méthodes, p. 61).

TABLEAU XII - Pourcentages corrigés de la radioactivité totale des glycannes oligomannosidiques séparés par H.P.L.C. (voir Fig.17) des cellules normales (E.H.) et transformées (BHK-HSV).

	$Man_5GlcNAc$	$Man_6GlcNAc$	$Man_7GlcNAc$	$Man_8GlcNAc$	$Man_9GlcNAc$
Cellules normales %	5,4	6,6	3,1	3,7	5,1
Cellules transformées %	3,5	7,6	6,2	6,7	7,4

réduits, puis digérés par l'α-mannosidase de la fève Jack. Les produits de fin de la réaction ont été analysés par chromatographie sur couche mince (voir Figure 18 ; p.153) et tous migrèrent respectivement comme le Manet le Man (ß1-4) GlcNAc itol. Aucun de ces glycannes ne présenta une résistance vis-à-vis de l'α-mannosidase indiquant l'absence de N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice. Les pourcentages de la radioactivité de ces deux produits confirment la nature des structures prévues, que le marquage métabolique par le mannose est homogène et que, surtout, il n'existe pas de différence qualitative entre les glycannes oligomannosidiques issus de cellules normales et transformées (voir Tableau XIII ; p.153). Toutefois, la seule réserve que l'on pourrait émettre concerne les oligosaccharides $Man_6GlcNAc$, $Man_7GlcNAc$ et $Man_8GlcNAc$ qui peuvent exister sous forme d'isomères que notre méthodologie ne nous a pas permis de différencier. S'il existe des différences qualitatives, elles ne peuvent se situer qu'à ce niveau.

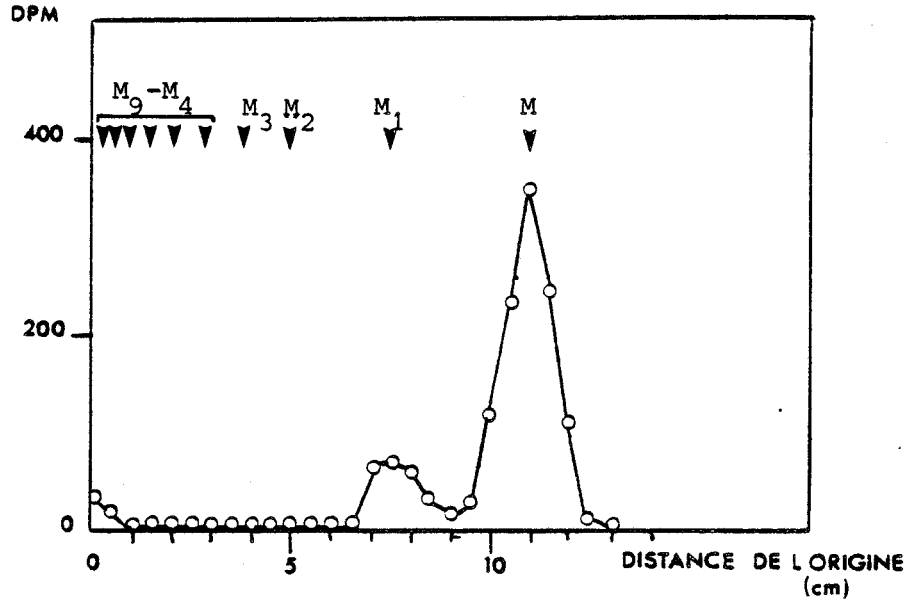


Figure 18- Comportement chromatographique d'un hydrolysat enzymatique (α-mannosidase) d'un glycanne oligomannosidique ($Man_7GlcNAc$ itol) sur couche mince, dans le solvant II (se reporter aux paragraphes Matériel et Méthodes p.66 et p.141); M_1 à M_9: témoins $Man_{1-9}GlcNAc$ itol, M: témoin mannose.

TABLEAU XIII - Rapports des produits finals de l'hydrolyse par l'α-mannosidase des glycannes oligomannosidiques des cellules normales et transformées, séparés par T.L.C..

	$Man_5GlcNAc$ itol	$Man_6GlcNAc$ itol	$Man_7GlcNAc$ itol	$Man_8GlcNAc$ itol	$Man_9GlcNAc$ itol
Cellule E.H.					
Man / Man(β1-4)GlcNAc Itol	4,1	5,2	5,8	7,4	8,3
Cellule BHK-HSV					
Man / Man(β1-4)GlcNAc itol	3,8	5,4	6,4	7,1	7,9
Rapports théoriques	4	5	6	7	8

BU LILLE

III - CONCLUSIONS

L'étude comparative que nous avons réalisée sur les glycannes de type oligomannosidique des cellules normales et transformées par un virus oncogène (H.S.V.) nous a permis de compléter les observations effectuées dans notre laboratoire et dans les laboratoires étrangers, sur les modifications structurales des glycannes des glycoprotéines membranaires accompagnant la transformation cellulaire. Il était établi que les changements majeurs affectaient les glycannes de type N-acétyllactosaminique et se traduisaient par un alourdissement des structures via une multiantennarisation et une hypersialylation des glycopeptides des cellules transformées, tandis que nous disposions de peu de renseignements sur les modifications affectant les glycannes de type oligomannosidique.

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que, quel que soit le précurseur monosaccharidique marqué utilisé (glucosamine ou mannose), les glycannes des cellules transformées s'enrichissaient en structures oligomannosidiques, qu'une quantification exacte nécessitait un marquage par le mannose et que l'on pouvait chiffrer dans ce cas cette augmentation à 25 %.

Ces résultats sont en accord avec ceux de CECCARINI et ATKINSON (-365-) qui trouvaient une augmentation de l'ordre de 35 %, mais sans tenir compte de la surestimation de cette valeur due au marquage par le mannose. Par contre, YAMASHITA et al. (-366-), indiquent que la transformation de fibroblastes induit une diminution de 25 % des oligosaccharides oligomannosidiques, calculée par marquage chimique externe des oligosaccharides.

D'autre part, les 5 glycannes de type oligomannosidique que nous avons obtenus, $Man_5GlcNAc_2$ à $Man_9GlcNAc_2$, sont présents dans les deux types cellulaires et, seules, leurs proportions relatives semblent modifiées. Toutefois, 3 d'entre eux peuvent exister sous forme

d'isomères, mais notre méthodologie ne nous a pas permis de les différencier. Il est à noter que nous n'avons pas retrouvé dans la fraction oligomannosidique, ni de glycannes oligomannosidiques plus petits que $Man_5GlcNAc_2$ ou plus grands que $Man_9GlcNAc_2$, ni et de glycannes de type hybride. Ces derniers résultats sont en accord avec ceux de YAMASHITA et al. (-367-).

Les différences quantitatives retrouvées sont essentiellement de deux ordres. Les glycopeptides des cellules transformées sont enrichis en glycannes oligomannosidiques les plus lourds (de 7 à 9 résidus de mannose), avec une augmentation globale de 40 %, mais ce glissement vers des structures oligomannosidiques plus lourdes n'est pas la seule explication de l'augmentation du taux de ces glycannes comme l'avaient proposé HAKIMI et ATKINSON (-368-). On remarque également une nette diminution de la structure $Man_5GlcNAc$ dans les cellules transformées (35 %) qui n'avait jamais été mentionnée.

Notre étude ne nous permet pas d'affirmer que ces glycannes oligomannosidiques appartiennent à des glycoprotéines dont la synthèse soit terminée ou s'il s'agit de précurseurs biosynthétiques. Néanmoins, RUPAR et COOK (-369-) ont pu montrer, par des expériences de chasse radioactive, qu'ils appartenaient bien à des glycoprotéines membranaires dont la maturation était terminée.

Bien que l'importance biologique de ce type de glycanne reste obscure, différentes études ont apporté quelque lumière sur leur rôle possible dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire (RAUVALA et HAKOMORI -370-) et leur modification à la surface des cellules malignes pourrait induire des phénomènes de reconnaissance aberrants.

Le plus difficile problème qu'il faudra surmonter de manière à mieux cerner le rôle des glycannes dans les modifications du comportement social des cellules lors de la transformation maligne, est dû au fait que, jusqu'à présent, aucune modification qualitative des

structures glucidiques n'a été mise en évidence. Cette compréhension passera donc par une étude très fine des régulations du métabolisme de ces composés dans les cellules normales et transformées.

CONCLUSIONS GENERALES.

Nos recherches ont permis de contribuer à l'étude de la structure primaire des glycannes des glycoprotéines et ont été dirigées, dans un premier temps, vers la mise au point de méthodologies fines permettant de travailler sur de très faibles quantités et d'aborder ainsi l'étude de glycoprotéines d'intérêt biologique majeur.

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes orientés vers l'étude de la fiabilité d'une méthode chimique de libération des glycannes des N-glycosylprotéines : l'hydrazinolyse. Nous avons appliqué ce protocole à des glycopeptides du fibrinogène bovin que le Dr. E. MOCZAR nous avait fournis en quantité relativement importante.

1 - Nous avons pu vérifier que l'hydrazinolyse était non seulement une méthode de libération quantitative des glycannes mais qu'elle n'induisait pas de modifications majeures de structure comme des désialylations partielles des glycannes.

2 - Après séparation des glycannes libérés par l'hydrazine et N-réacetylés, nous avons déterminé la structure primaire complète des deux glycannes majeurs du fibrinogène bovin grâce à l'application des techniques classiques suivantes : méthanolyse, méthylation couplée à la spectrométrie de masse et R.M.N. du proton en collaboration avec le groupe du Professeur J.F.G. VLIEGENTHART. Ces glycannes biantennés, mono et disialylés (les structures sont données p.92) sont communs à de nombreuses glycoprotéines et on les retrouve également dans le fibrinogène humain.

Le fibrinogène bovin contient à la fois les acides N-acétyl et N-glycolyl neuraminiques dans des proportions identiques. Hors, l'emploi de l'hydrazinolyse fait disparaître cette hétérogénéité et il ne nous a pas été possible de positionner ces résidus sur les chaînes oligosaccharidiques.

Nous avons utilisé la même approche méthodologique pour l'étude de la copule glucidique de l'hémocyanine du scorpion Androctonus australis. Après hydrazinolyse et N-réacétylation, un seul glycanne de type oligomannosidique a été identifié par chromatographie sur couche mince et nous avons pu, après méthylation et analyse en R.M.N. du proton, établir sa structure primaire. Il s'agissait du glycanne Man_9 $GlcNAc_2$ qui a été retrouvé également dans des glycoprotéines d'insectes, ce qui tend à prouver que la simplification des structures glycanniques serait un marqueur de l'évolution. Mais la présence, chez les Arthropodes, d'oligosaccharides uniquement de type oligomannosidique soulève le problème de l'activité biologique de ce type de glycanne.

Dans un deuxième temps, nous avons développé une méthodologie d'études structurales de glycannes disponibles en très faibles quantités, par l'utilisation de marquages radioactifs de ces composés et par l'établissement de cartes chromatographiques permettant une appréciation de l'hétérogénéité des glycannes. En collaboration avec l'équipe du Professeur M. GOUDEMAND, nous avons appliqué ces méthodologies à l'étude de la copule glucidique du facteur VIII/facteur de von Willebrand.

1 - Nos premières expérimentations nous ont permis de confirmer la co-existence de glycannes de types O-glycosidique et N-glycosidique dans ce complexe et d'identifier par chromatographie sur couche mince une dizaine de O-glycannes libérés par ß-élimination en milieu réducteur et au moins 3 glycannes libérés par hydrazinolyse, dont le majeur représentait 45 % des oligosaccharides totaux.

2 - Ce glycanne majeur a été isolé par électrophorèse papier préparative à haut voltage en quantité suffisante (200 µg) pour pouvoir déterminer sa structure primaire complète sur la base des résultats de la méthylation et de l'analyse en R.M.N. du proton. Il s'agissait d'un glycanne biantenné, fucosylé sur la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine et monosialylé (voir p.112).

3 - La séparation des glycannes liés N-glycosidiquement par chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B et l'analyse des fractions par chromatographie sur couche mince révélée par autoradiographie nous ont permis d'identifier, outre le glycanne majeur, 9 glycannes mineurs représentant 25 % des oligosaccharides totaux du FVIII/vWf.

L'hétérogénéité et la complexité des glycannes posent le problème de leur participation dans le mécanisme de l'hémostase primaire. Néanmoins, la miniaturisation de ces méthodes pourrait permettre l'établissement de telles cartes chromatographiques de glycannes isolés de FVIII/vWf anormaux, comme ceux de plasmas de malades appelés "variant de von Willebrand".

Dans le cadre d'une collaboration efficace avec Mme A. CAHOUR, nous avons appliqué notre méthodologie à l'étude des glycannes des IgM normales et de macroglobulinémie de Waldenström. Ces travaux ont conduit à la détermination de leurs structures primaires (voir p.134) et nous ont permis de mettre en évidence de nettes différences quantitatives entre les glycannes des IgM normales et pathologiques. Néanmoins, nous n'avons pu dégager de marqueur glycannique spécifique de cette maladie.

Nos travaux s'inscrivent également dans le cadre de recherches menées au laboratoire sur les modifications des structures glycanniques accompagnant la transformation cellulaire. Nous avons réalisé une étude comparative des glycannes de type oligomannosidique de fibroblastes normaux et transformés par un virus oncogène (H.S.V.), qui diffère d'un point de vue méthodologique des travaux précédents par l'utilisation d'une méthode enzymatique de libération des glycannes. L'utilisation de l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H couplée à la chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose 4B nous a permis d'isoler spécifiquement les oligosaccharides de type oligomannosidique $Man_5GlcNAc$ à $Man_9GlcNAc$ à partir des cellules normales et transformées marqués métaboliquement par la glucosamine ^3H ou ^{14}C ou le mannose 2-^3H.

Nous avons pu montrer que, quel que soit le précurseur monosaccharidique utilisé, les glycannes des cellules transformées s'enrichissaient en structures oligomannosidiques et ce résultat est en accord avec les différents travaux antérieurs.

Après séparation des oligosaccharides de type oligomannosidique marqués par le 2-[^{3}H] mannose par H.P.L.C. en 5 composés, de Man_5 GlcNAc à Man_9 GlcNAc, et vérification de leur structure par l'action d'une α-mannosidase, nous avons apporté les démonstrations suivantes :

1 - Ces 5 glycannes sont présents dans les cellules normales et transformées. Il n'existe donc pas de différence qualitative.

2 - Il existe par contre des différences quantitatives qui sont de deux ordres : les glycoprotéines des cellules transformées sont enrichies en glycannes oligomannosidiques les plus lourds (Man_7 GlcNAc à Man_9 GlcNAc), l'augmentation étant de l'ordre de 40 %, et l'oligosaccharide Man_5 GlcNAc se trouve nettement diminué (35 %) dans les cellules transformées.

Il est bien établi que les modifications majeures affectant les glycannes lors de la transformation cellulaire se traduisent par un alourdissement des structures de type N-acétyllactosaminique, mais que les modifications restent quantitatives. Nos travaux complètent ces études en précisant que d'autres changements affectant les glycannes de type oligomannosidique accompagnent la transformation maligne des cellules et pourraient être une des causes des phénomènes de reconnaissances aberrants, comme la diminution de l'adhésivité cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

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

	Références	Pages
AKABORI S., OHNO K., NARITA K. Bull. Chem. Soc. Japon, 25 (1952) 214	247	62
AKIYAMA Y., KATO K. Agric. Biol. Chem., 41 (1977) 79-81	21	10
ALBERGONI V., CASSINI A. Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 46 (1970) 936-938	283	71
ALLAN D., CRUMPTON M.J. Exp. Cell. Res., 78 (1973) 271-278	150	40
ALLEN A.K., DESAI N.N., NEUBERGER A., CREETH J.M. Biochem. J., 171 (1978) 665-674	19 22	10 10
ANDERSON G.W., VASILE E., MELLO R.J., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. Cell, 15 (1978) 919	163	42
ASHWELL G., MORELL A. 1978, in the Glycoconjugates Vol. II, HOROWITZ M. and PIGMAN W. (Eds.), Academic Press, New-York, London 231-234	6 179	7 44
ATKINSON P.H., HAKIMI J. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Pro- teoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 191-228	184 216 233	48 52 56
AUB J.C., TIESLAU C., LANKESTER A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 50 (1963) 613	3	7
AUB J.C., SANFORD B.H., COTE M.N. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54 (1965) 396-399	194	49
AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. Arch. Biochem. Biophys., 175 (1976) 410-418	96	28
BAEZINGER J., KORNFELD S, J. Biol. Chem., 249 (1974) 7260-7269, 7270-7280	67	19
BAEZINGER J.U., NATOWICZ M. Anal. Biochem., 112 (1981) 357-361	258	64
BALLOU C.E. Adv. Microb. Physiol., 14 (1976) 93-158	63	18
BAYARD B., KERCKAERT J.P., ROUX D., STRECKER G. 1979, in Protides of Biological Fluids, PEETERS H. (Ed.), Pergamon Press, 153-156	260	66

	Références	Pages
BAYARD B., MONTREUIL J. 1973, in "Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des glycoconjugués", MONTREUIL J. (Ed.), Editions du CNRS, Paris, 1974, 208-218	246 249	61 62
BELCHER R., NUTTEN A.J., SAMBROOK C.M. Analyst., 79 (1954) 201	269	68
BENNETT B., FORMAN W.B., RATNOFF O.D. J. Clin. Invest., 52 (1973) 2191-2197	320	95
BEYERS T.A., PRIEELS J.P., HILL R.L. 1979, in the Proceedings of the IVth International Symposium on Glycoconjugates, Vol. II, GREGORY J.C. et JEANLOZ R.W. (Eds), Academic Press, New-York, 641-643	113	30
BEELEY J.G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76 (1977) 1051-1055	97	28
BISCHOFF J., KORNFELD R. J. Biol. Chem., 258 (1983) 7907-7910	104	29
BLITHE D.L., BUCK C.A., WARREN L. Biochemistry, 19 (1980) 3386-3395	222 358	54 136
BLOBEL G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 (1980) 1496-1500	137	38
BOONE C.W., JACOBS J.B. J. Supramol. Struct., 5 (1976) 131	215	52
BRENCKLE R., KORNFELD R. Arch. Biochem. Biophys., 201 (1980) 160-173	357	124
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. Biochemistry, 9 (1970) 4567-4576	198 202 211 218	49 49 52 53
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. Science, 172 (1971a) 169-171	203	49
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. Biochemistry, 10 (1971b) 2176-2180	204	49
BUCK C.A., FUHRER J.P., SOSLAU G., WARREN L. J. Biol. Chem., 249 (1974) 1541-1550	219 226	53 54
BURGER M.M., GOLDBERG A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57 (1967) 359-366	4	7
BUTTERS T.D., DEVALIA V., APLIN J.C., HUGHES R.C. J. Cell. Sci., 44 (1980) 33-58	161	42

	Références	Pages
BUTTERS T.D., HUGHES R.C. Biochim. Biophys. Acta, 640 (1981) 655-671	58 61 292	17 18 71
BUTTERS T.D., HUGHES R.C., VISCHER P. Biochim. Biophys. Acta, 640 (1981) 672-686	288	71
BUTTLER W.T., CUNNINGHAM L.W. J. Biol. Chem., 241 (1966) 3882-3888	38	13
CACAN R., HOFLACK B., VERBERT A. Eur. J. Biochem., 106 (1980) 473-479	94 362	28 139
CAEN J.P., LEVY-TELEDANO S. Nature New.Biol., 244 (1973) 159-161	308	94
CAHOUR A., OLLIER-HARTMANN M.P., MIHAESCO C., HARTMANN L. Biomedicine, 35 (1981) 133-136	348	122
CALLAGHAN-ROSE M., VOTER W.A., SAGE H., BROWN C.F., KAUFMAN B. J. Biol. Chem., 259 (1984) 3167-3172	122	34
CECCARINI C., MURAMATSU T., TSANG J., ATKINSON P.H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72 (1975) 3139-3145	234	56
CECCARINI C., ATKINSON P.H. Biochim. Biophys. Acta, 500 (1977) 197-207	236 365	56 154
CHAPMAN A., KORNFELD R. J. Biol. Chem., 254 (1979) 816-823, 823-828	52 60 79 82 86 294 349 353	17 18 21 22 23 86 123 123
CHAPMAN A., LI E., KORNFELD J. Biol. Chem., 254 (1979) 10243-10249	91	25
CHERON A., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J. Biochimie, 58 (1976) 927-942	65	19
CHU F.K., TRIMBLE R.B., MALEY F. J. Biol. Chem., 253 (1978) 8691-8693	127	35
CLAMP J.R., JOHNSON I. 1972, in Glycoproteins : Their Composition, Structure and Function, GOTTSCHALK, A.J. (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 612-652	346	121

	Références	Pages
COHEN R.E., BALLOU C.E. Biochemistry, 19 (1980) 4345-4358	350	123
COMAN D.R. Cancer Res., 4 (1944) 625-629	189	48
CONCHIE J., STRACHAN I. Carbohydr. Res., 63 (1978) 193-213	54	17
COUNTS R.B., PASKELL S.L., ELGEE S.K. J. Clin. Invest., 62 (1978) 702-709	313	95
CRETEL A., PAMBLANCO M., EGGE H., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK G. 1979, in the Proceedings of the Vth International Symposium on Glycoconjugates, SCHAUER R., BOER P., BUDDECKE E., KRAMER M.F., VLIEGENTHART J.F.G., WIEGAND H. (Eds) Georg Thieme Publisher, Stuttgart, 250-251	32	12
CUMMINGS L.C., KORNFLED S. J. Biol. Chem., 257 (1982) 11230-11234	153	40
DAHR W., UHLENBRUCK G., GUNSON H.H., VAN DER HART M. Vox Sang., 28 (1975) 249-252	25 27	11 12
DEBRAY H. Bull. Cancer (Paris), 66 (1979) 353-372	185	48
DEBRAY H., MONTREUIL J. Biochimie, 60 (1978) 697-704	259 344 364	65 115 142
DEBRAY H., DELANNOY P., DEBEIRE P., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., (1985) soumis pour publication	200	49
DEFENDI V., LEHMAN J., KRAMER P. Virology, 19 (1963) 592	214	52
DELANNOY P., DEBRAY H., MONTREUIL J. C.R. Acad. Sci., Paris, (1985) soumis pour publication	240	58
DE MARCO L., SHAPIRO S. J. Clin. Invest., 68 (1981) 321-328	334	96
DISCHE Z. Mikrochemie, 8 (1930) 4	270	68
DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., 100 (1979) 569-574	76	21
DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. Anal. Biochem., 28 (1956) 350-356	251	62

	Références	Pages
EBERT W., ROELCKE D., WEICKER H. Eur. J. Biochem., 53 (1975) 505-515	142	39
ELBEIN A.D. Ann. Rev. Plant. Physiol., 30 (1979) 239-272	90	25
ELSON L.A., MORGAN W.T.J. Biochem. J., 27 (1933) 1824	268	68
EMMELOT P., VAN BEEK W.P., SMETS L.A. 1977, in Membranes Alterations of Liver Injury, Falk Symposium 32, POPPER H.P., BIANCHI L., REUTTER W., (Eds.), MTP Press Limited, Lancaster 179-195	229	56
EYLAR E.H. J. Theor. Biol., 10 (1965) 89-113	166	43
FASS D.N., KNUTSON J., BOWIE J.W. J. Lab. Clin Med., 91 (1978) 307-320	318	95
FIALA S., FIALA A.E., DIXON B. J. Natl. Cancer Inst., 48 (1972) 1313	242	58
FINCHER G.B., SAWYER W.H., STONE B.A. Biochem. J., 139 (1974) 535-545	41	13
FINNE J. Biochim. Biophys. Acta, 412 (1975) 317-325	28	12
FIRON N., OFEK I., SHARON N. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105 (1982) 1426-1432	146	40
FISCHER F.G., NEBEL H.G. Z. Physiol. Chem., 302 (1955) 10	263	67
FLETCHER A.P., MARKS G.S., MARSHALL R.D., NEUBERGER A. Biochem. J., 87 (1963) 265-273	46	15
FOURNET B., MONTREUIL J., STRECKER G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., BINETTE J.P., SCHMID K. Biochemistry, 17 (1978) 5206-5214	72	20
FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y. MONTREUIL J. Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502	275	69
FRANCOIS-GERARD C., PIERCE-CRETEL A., ANDRE A., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., MONTREUIL J., SPIK G. 1983, in the Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A. et SVENSSON S. (Eds), Lund-Ronneby, 169-170.	75	20

	Références	Pages
GIBSON R., SCHLESINGER S., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 3600-3607	123	34
GIBSON R., KORNFLED S., SCHLESINGER S. Trends Biochem. Sci., 5 (1980) 290-293	124	34
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S. J. Biol. Chem., 256 (1981) 456-462	125	34
GLICK M.C., RABINOWITZ S., SACHS L. J. Virol., 13 (1974) 967-974	205	50
GOGSTAD G.O., HELGELAND L. 1982, in the Glycoconjugates, Vol. III, MARTIN J., HOROWITZ M. (Eds.), Academic Press, New-York, 99-112	136 139	38 38
GOTTSCHALK A. Nature, 186 (1960) 949-951	2	7
GOTTSCHALK A., GRAHAM E.R.B. Biochim. Biophys. Acta, 34 (1959) 380-391	8	7
GOTTSCHALK A., FAZEKAS de St. GROTH Biochim. Biophys. Acta, 43 (1960) 513	121	34
GOUDEMAND J., MAZURIER C., SAMOR B. BOUQUELET S., MONTREUIL J., GOUDEMAND M. Thromb. Haem., 53 (1985) 390-395	340	96
GOYFFON M. C.R. Soc. Biol., 164 (1970) 374-376	279	70
GRABEL L.B., ROSEN S.D., MARTIN G.R. Cell, 17 (1979) 477-484	360	137
GRALNICK H.R., SULTAN Y., COLLER B. N. Engl. J. Med., 296 (1977) 1024-1030	333	96
GRALNICK J. Clin. Invest., 62 (1978) 496-500	338	96
GRALNICK H.R.,JACKSON G.M., WILLIAMS S.B. GREGGER M.C. Blood, 59 (1982) 1310-1316	327	95
GRIMMONPREZ L., MONTREUIL J. Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968) 843-855	255	64
GRINNA L.S., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem., 254 (1979) 8814-8818	101	29
HADDEN J.W., HADDEN E.M., SADLIK J.R., COFFEY R.G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976) 1717-1721	149	40

	Références	Pages
HAKIMI J., ATKINSON P.H. Biochemistry, 19 (1980) 5619-5624	237 368	57 155
HAKOMORI S.I., MURAKAMI W.T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 59 (1968) 254-261	195	49
HAKOMORI S. Biochim. Biophys. Acta, 417 (1975) 55-89	187	48
HALL R.L., WOOD E.J., KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G. Biochem. J., 165 (1977) 173-176	286	71
HANOVER J.A., LENNARZ W.J. Arch. Biochem. Biophys., 211 (1981) 1-19	98	28
HARPAZ N., SCHACHTER H. J. Biol. Chem., 255 (1980) 4894-4902	106	29
HASCALL V.C. 1981, in Biology of Carbohydrates, GINSBURG V., ROBBINS P. (Eds.) J. WILEY and Sons, New-York, 1-49	14 35 42	10 13 14
HASE S., OSAWA K., IHENAKA T. J. Biochem., 91 (1982) 735-737	56	17
HASHIMOTO C., COHEN R.E., ZHANG W.J., BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78 (1981) 2244-2248	59	17
HASHIMOTO Y., PIGMAN W. N.Y. Acad. Sci., 93 (1962) 541	23	11
HASILIK A., KLEIN U., WAHEED A., STRECKER G., VON FIGURA K. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 (1980) 7074-7078	176	44
HASILIK A., NEUFELD E.F. J. Biol. Chem., 255 (1980) 4937-4945	174	44
HASILIK A., WAHEED A., VON FIGURA K. Biochem. Biophys. Res. Comm., 98 (1981) 761-767	178	44
HEANEY-KIERAS J., RODEN L., CHAPMAN D.J. Biochem. J., 165 (1977) 1-9	15	10
HERSHGOLD E.J., SILVERMAN L., DAVISON A.M., JANSZEN M. Fed. Proc., 26 (1967) 488	321	95
HERSHGOLD E.J. Ann. N.Y. Acad. Sci., 240 (1975) 70-73	315	95

	Références	Pages
HICKMAN S., KORNFELD R., OSTERLAND C.K., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 247 (1972) 2156-2163	354	124
HOFLACK B., DEBEIRE P., CACAN R., MONTREUIL J., VERBERT A. Eur. J. Biochem., 124 (1982) 527-531	100 254	28 63
HOUGIE C., DENSON K.W.E., BIGGS R. Thromb. Diath. Haemorrh., 18 (1967) 211	305	94
HOUSLEY T.J., ROWLAND F.N., LEDGER P.W., KAPLAN J., TANZER M.L. J. Biol. Chem., 255 (1980) 121-128	171	43
HSIEH P., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem., 259 (1984) 2375-2382	116 290 291	31 71 71
HUBER R., DEISENHOFER J., COLMAN P. MATSUSHIMA M., PALM W. Nature (London), 264 (1976) 415	347	121
HUGHES R.C., MILLS G., STOJANOVIC D. 1983, in Structural Carbohydrates in the Liver, Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds.) MTP Press Limited, Lancaster, 63-81	120 154	34 41
HYNES R.O. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70 (1973) 3170-3174	188 196 239	48 49 58
INBAR M., SACHS L. Nature, 223 (1969) 710-712	5	7
ISEMURA S., SCHMID K. Biochem. J., 124 (1971) 531	250	62
ITO S., YAMASHITA K., SPIRO R.G., KOBATA A. J. Biochem., 81 (1977) 1621-1631	293	44
IWASAKI M., INOUE S., KITAJIMA K., NOMOTO H., INOUE Y. Biochemistry, 23 (1984) 305-331	31	12
JOUANNEAU J., FOURNET B., BOURRILLON R. Biochim. Biophys. Acta, 667 (1981) 277-284	351	123
KAO K.J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. J. Clin. Invest., 63 (1979) 656-664	309	94
KAO K.J. PIZZO S.V. Mc KEE P.A. J.Biol. Chem., 255 (1980) 10134-10139	336	96
KAO K.J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. Blood, 57 (1981) 579-585	311	94

	Références	Pages
KAPLAN A., ACHORD D.T., SLY W.S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 2026-2030	175	44
KASS L., RATNOFF O.D., LEON M.A. A.J. Clin. Invest., 48 (1969) 351-358	322	95
KATHAN R.H., WINZLER R.J. J. Biol. Chem., 238 (1963) 21-25	144	39
KAWASAKI T., ASHWELL G. J. Biol. Chem., 251 (1976) 5292-5299	180	46
KELLER R.K., SWANK G.D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 85 (1978) 5332-5337	167	43
KOBATA A., YAMASHITA K., HITOI A., TANIGUCHI N., YOKOSAWA N. 1983, in the Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A., SVENSSON S. (Eds.) Lund-Ronneby, 181-182	243	58
KOLB-BACHOFFEN V., SCHLEPPER-SCHAFER J., TERADEIRA R., VOGT D., KOLB H. 1983, in Structural Carbohydrates in the Liver, Falk Symp. 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds) MTP Press Limited, Lancaster, 277-286	182	46
KORNFELD S. 1982, in the Glycoconjugates, Vol. II, MARTIN J., HOROWITZ M. (Eds), Academic Press, New-York, 3-23	126	35
KORNFELD R., KORNFELD S. Annu. Rev. Biochem., 45 (1976) 217-237	134	36
KREISEL W., BUCHSEL R., VOLK B., REUTTER W., GEROK W. 1983, in Structural Carbohydrates in the Liver, Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F. KOTTGEN E. (Eds) MTP Press Limited, Lancaster, 51-61	135 162	37 42
KROTKIEWSKI H., LISOWSKA E. Arch. Immunol. Ther. Exp., 26 (1978) 139-144	343	99
KUO S.C., LAMPEN J.O. Biochem. Biophys. Res. Comm., 58 (1974) 287-295	170	43
LAKI K., MESTER L. Biochim. Biophys. Acta, 57 (1962) 152-153	300	87
LAMPORT D.T.A., KATONA L., ROERIG S. Biochem. J., 133 (1973) 125-131	18	10

	Références	Pages
LAMY J., BIJLHOLT M.C., SIZARET P.J., LAMY J., VAN BRUGGEN E.F.J. Biochemistry, 20 (1981) 1849-1856	282	71
LAMY J., LAMY J., WEILL J. Arch. Biochem. Biophys., 193 (1979) 140-149	280	70
LASKEY R.A., MILLS A.D. Eur. J. Biochem., 56 (1975) 335-341	262	66
LEGAZ M.E., SCHMER G., COUNIS R., DAVIE E. J. Biol. Chem., 248 (1973) 3946-3955	323	95
LENDERS J.P., CRICHTON R.R. Biotech. Bioeng., 26 (1984) 1343-1351	129	35
LEVINE E.M., BECKER Y., BONNE C.W., EAGLE H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 53 (1965) 35	191	48
LI E., KORNKELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 1600-1605	51	17
LIANG C.J., YAMASHITA K., MUELLENBERG C.G., SICHI H., KOBATA A. J. Biol. Chem., 254 (1975) 6414-6418	80 81	21 22
LIS H., SHARON N. J. Biol. Chem., 253 (1978) 3468-3476	296	86
LLOYD C. Biol. Ref., 50 (1975) 325-350	193	48
LLOYD K.O., KABAT E.A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 61 (1968) 1470-1477	26	11
LOH Y.P., GAINER H. FEBS Lett., 96 (1978) 269-272	133	35
MARKL J., SCHMID R., CZICHOS-TIEDT S., LINZEN B. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357 (1976) 1713-1725	284	71
MARSHALL R.D., NEUBERGER A. Adv. Carbohydr. Chem., 25 (1970) 407-478	95	28
MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUDEMAND M., MONTREUIL J. Path., Biol., 23 suppl. (1975) 11-16	314 319	95 95
MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., SAMOR B., GOUDEMAND M., MONTREUIL J. C.R. Acad. Sc. Paris, 288 (1979) 1431-1434	342	98
MAZURIER C., SAMOR B., PARQUET-GERNEZ A., FOURNET B., GOUDEMAND M., MONTREUIL J. 1980, in Protides of Biological Fluids, 28th Colloquium, H. Peeters (ed.), 299-302	326 329 341	95 95 97

	Références	Pages
MEAGER A., UNGKITCHANUKIT A., HUGHES R.C. Biochem. J., 154 (1976) 113-124	152	40
MEEZAN E., WU H., BLACK P., ROBBINS P.W. Biochemistry, 8 (1969) 2518-2524	197	49
MELLIS S.J., BAEZINGER J.U. J. Biol. Chem., 258 (1983) 11546-11555	62 356	18 124
MICHALSKI J.C., PETER-KATALANIC J., EGGE H., PAZ-PARENTE J., MONTREUIL J., STRECKER G. Carbohydr. Res., 134 (1984) 177-189	253	63
MILLER D.H., LAMPORT D.T.A., MILLER M. Science, 176 (1972) 918-920	40	13
MIZRAHI A., O'MALLEY J.A., CARTER W.A., TAKATSUKI A., TAMURA G., SULKOWSKI E. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7162-7615	168	43
MIZUOCHI T., TANIGUCHI T., ASAMI Y., TAKAMATSU J., OKUDE M., IWANAGA S., KOBATA A. J. Biochem., 92 (1982) 283-293	301 303	87 87
MIZUOCHI T., TANIGUCHI T., FUJIKAWA K., TITANI K., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 6020-6025	70	19
MONSIGNY M., KIEDA C., ROCHE A.C. Biol. Cell., 36 (1979) 239-300	183	44
MONTREUIL J. Pure and Appl. Chem., 42 (1975) 431-477	11 49 64 244	9 16 18 60
MONTREUIL J. Compr. Biochem., 19B, part II (1982) 1-188	7 12 50 88 99	7 9 17 24 28
MONTREUIL J., Biol. Cell, 51 (1984) 115-132	245	60
MONTREUIL J., SPIK G. 1963, "Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux", Lab. Chimie Biologique, Fac. Sci. (Ed.), Lille	265	67
MORISATO D.K, GRALNICK H.R. Blood, 55 (1980) 9-15	310 337 339	94 96 96
MURAMATSU T., ATKINSON P.M., NATHENSON S.G. CECCARINI C. J. Mol. Biol., 80 (1973) 781-799	363	139

	Références	Pages
MURAMATSU T., OGATA M., KOIDE N. Biochim. Biophys. Acta, 444 (1976) 53-68	227	54
MURAMATSU T., KOIDE N., CECCARINI C., ATKINSON P.H. J. Biol. Chem., 251 (1976) 4673-4679	235	56
MURAMAYA K. , NICHOLS E.J. , LEVERY S.B. , CARTER W.G. ,HAKOMORI S.I. Glycoconjugates J., 1 (1984) 155-169	241	58
MUTSAERS J.H.E.M., VAN HALBEEK H., KAMERLING J.P. VLEGENTHART J.F.G. Eur. J. Biochem., 147 (1985) 569-574	297	44
NAKAJIMA T., BALLOU C.E. J. Biol. Chem., 249 (1974) 7679-7684	16 37 44	10 13 14
NATHENSON S.G., CULLEN S.E. Biochim. Biophys. Acta, 344 (1974) 1-25	143	39
NICOLSON G.L., BLAUSTEIN J. Biochim. Biophys. Acta, 266 (1972) 543-547	151	40
NICOLSON G.L. Biochim. Biophys. Acta, 458 (1976) 1-72	186	48
NILSSON B., NORDEN N.E., SVENSSON S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 4545-4553	69	19
NISHIBE H., TAKAHASHI N. Biochim. Biophys. Acta, 661 (1981) 274-279	299	87
NORDIN J.H., GOCHOCO C.H., PURCELL J.P., WOJCHOWSKI D.M., KUNKEL J.G. 1984, in the Proceedings of the XII International Carbohydrate Symposium, VLIEGENTHART J.F.G., KAMERLING J.P., VELDINK G.A. (Eds.), Utrecht	298	86
NOVIKOFF A.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976) 2781-2787	172	44
NUENKE R.H., CUNNINGHAM L.W. J. Biol. Chem., 236 (1961) 2451-2460	47	15
OGATA S.J., MURAMATSU T., KOBATA A. Nature (London), 259(1976) 580-582	210 221	51 53
OLDEN K., PRATT R.M., YAMADA K.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 (1979) 3343-3347	160	42
OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem., 254 (1978) 1017-1023	103	29
PALO J., SAVOLAINEN H. J. Chromatogr., 65 (1972) 447-450	261	66

	Références	Pages
PARDEE A. Biochim. Biophys. Acta, 417 (1975) 153-171	192	48
PAULSON J.C., PRIEELS J.P., GLASGOW L.R., HILL R.L. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5617-5624	112	30
PAULSON J.C., SADLER J.E., HILL R.L. J. Biol. Chem., 254 (1979) 2120-2124	145	39
PAULSSEN M.M.P., VANDENBUSSCHE-SCHEFFERS H.L., SPAAN P.B., DE JONG T., PLANJE M.C. Thromb., Diath. Haemorr., 31 (1974) 328-338	324	95
PAZ-PARENTE J., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. J. Chromatogr., 249 (1982) 199-204	264	67
PEARSE B.M.F. J. Mol. Biol., 97 (1975) 93	164	42
PICARD J., CARON M., CAPEAU J., CHERQUI G., LASCOLS O. 1983, in Structural Carbohydrates in the Liver, Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds), MTP Press Limited, Lancaster, 363-374	148	40
PIERCE-CRETEL A., PAMPLANCO M., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK G. Eur. J. Biochem., 125 (1982) 383-388	68	19
PIERCE-CRETEL A., DEBRAY H., MONTREUIL J., SPIK G., VAN HALBEEK H., MUTSAERS J.H.G.M., VLIEGENTHART J.F.G. Eur. J. Biochem, 139 (1984) 337-345	355	124
POLLACK L., ATKINSON P.H. J. Cell. Biol., 97 (1983) 293-300	115	31
QUESADA ALLUE L.A. Mol. Cell. Biochem., 33 (1980) 149-155	289	71
RAHMSDORF H.J., CAILLA H.L., SPITZ E., MORAN M.J., RICKENBERG H.V. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976) 3183-3187	158	41
RAUVALA H., HAKOMORI S. J. Cell. Biol., 88 (1981) 149-159	361 370	137 155
READING C.L., PENHOET E.E., BALLOU C.E. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5600-5612	252	62
RIMINGTON C. Biochem. J., 25 (1931) 1062	267	67

	Références	Pages
ROCK G.A., TACKABERRY E.S., PALMER D.S. Thromb. Res., 14 (1979) 573-587	316	95
ROCK G., CRUICKSHANK W.H., PALMER D.S., Thromb. Res., 21 (1981) 53-63	332	96
RODEN L. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycannes, LENNARZ W.J. (Ed.) Plenum Press, New-York, 267-371	13 34	10 13
ROSEMAN S. Chem. Phys. Lip., 5 (1970) 270-297	155	41
ROTH S., Mc GUIRE E.J., ROSEMAN S. J. Cell. Biol., 51 (1971) 536-541	156	41
ROTH S. Q. Rev. Biol., 48 (1973) 541-563	117	33
RUPAR C.A., COOK G.H. Biochem. J., 201 (1982) 377-385	238 369	57 155
RUSSIN T.Z., LAINE R.A., TURCO S.J. Biochem. J., 197 (1981) 327-332	114	30
SARJI K.E., STRATTON R.D., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71 (1974) 2937-2941	312	94
SCHACHTER H., ROSEMAN S. 1980, in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 85-160	89 110	24 30
SCHACHTER H., NARASIMHAN S., GLEESON P., VELLA G. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 61 (1983) 1049-	93 107 109	27 30 30
SCHAUER R. Methods Enzymol., 50 (1978) 64-89	273	68
SCHWARZ R.T., DATEMA R. 1982, in The Glycoconjugates, vol. III, MARTIN I., HOROWITZ M. (Eds.), Academic Press, New-York, 47-75	119	33
SCHWARZ R.T., DATEMA R. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 40 (1982) 287-379	131	35
SEGHATCHIAN M.J., NILSSON I.M., HOLMBERG L., MILLER-ANDERSON M. Thromb. Res., 14 (1979) 589-598	317	95
SHAPIRO G.A., ANDERSEN J.C., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. J. Clin. Invest., 52 (1973) 2198-2210	330	95

	Références	Pages
SIZARET P.Y., FRANK J., LAMY J., WEIL J., LAMY J.N. Eur. J. Biochem., 127 (1982) 501-506	281	70
SLOMIANY A., SLOMIANY B.C. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7301-7306	33	12
SLY W.S., FISCHER D.H. J. Cell. Biochem., 18 (1982) 67	177	44
SMETS L.A., VAN BEEK W.P. 1983, in Structural Carbohydrates in the Liver, Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds.), MTP Press Limited, Lancaster, 325-332	199	49
SMETS L.A., VAN BEEK W.P., VAN ROOIJ H. Int. J. Cancer, 18 (1976) 462-468	228	56
SODETZ J.M., PIZZO S.V., Mc. KEE P. J. Biol. Chem., 252 (1977) 5538-5546	335	96
SODETZ J.M., PAULSON J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. J. Biol. Chem., 254 (1979) 10754-10760	325 328	95 95
SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J. 1973, in "Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués", MONTREUIL J. (Ed.), Editions du CNRS, Paris, 1974, 483-500	10	8
SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., MONTREUIL J. FEBS Lett., 50 (1975) 296-299	66 256	19 64
SPIK G., DEBRUYNE V., MONTREUIL J. 1983, in Structural Carbohydrate in the Liver, Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds.), MTP Press Limited, Lancaster, 477-483	217	53
SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J. C.R. Acad. Sci. Paris, 288 D (1979) 1018-1023	71 76	20 21
SPIRO R.G. J. Biol. Chem., 242 (1967) 1923-1932	20 39	10 13
SPIRO R.G., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem., 255 (1980) 5347-5354	17 36 43	10 13 14
SPRINGER G.F., DESAI P.R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61 (1974) 470-475	28	12
SPRINGER G.F., YANG H.J. Immunochemistry, 14 (1977) 497-502	140	39

	Références	Pages
SPRINGER G.F., SCHIRRMACHER V., DESAI P.R., CHEINGSONG-POPOV R., TEGMEYER H. 1983, in the Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A., SVENSSON S. (Eds.), Lund-Ronneby, 621-622	159	41
STANELONI R.J., UGALDE R.A., LELOIR L.F. Eur. J. Biochem., 105 (1980) 275-278	92	25
STOCKERT R.J., MORELL A., SCHEINBERG I.H. Science, 197 (1977) 667-668	181	44
STRUCK D.K., SIUTA D.B., LANE H.D., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5332-5337	169	43
STRUCK D.K., LENNARZ W.J. 1980, in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 35-83	118	33
TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7779-7786	105	29
TAI T., YAMASHITA K., ITO S., KOBATA. A J. Biol. Chem., 252 (1977) 6687-6694	55 78	17 21
TAKASAKI S., IKESHIRA H., KOBATA A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 (1980) 735-742	223 225 359	54 54 137
TANABE T., PRICER W.E., ASHWELL G. J. Biol. Chem., 254 (1979) 1038-1043	165	43
TANAKA K., BERTOLINI M., PIGMAN W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16 (1964) 404	24	11
THOMAS D.B., WINZLER R.J. J. Biol. Chem., 244 (1969) 5943-5946	29	12
TILLMANS J., PHILIPPI K. Biochem. Z., 215 (1929) 36	266	67
TODARO G.J., GREEN H. J. Cell. Biol., 17 (1963) 299-313	190	48
TONEGAWA Y., DOI T. 1983, in the Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A., SVENSSON S. (Eds.), Lund-Ronneby, 608-609	157	41
TOPFER-PETERSEN E., HENSCHEN A. Thromb. Research., 11 (1977) 881-892	304	97

	Références	Pages
TOPFER-PETERSEN E. 1980, in Fibrinogen, Fibrin and Fibrin Glue, SCHIMPF K. (Ed.) F.K. SCHATTAUER, Stuttgart, 43-45	302	87
TREVELYAN W.E., PROCTER D.P., HARRISON J.S. Nature (London), 166 (1950) 444	257	64
TSCHOPP T.B., WEISS H.J., BAUMGARTNER H.R. Lab. Clin. Med., 83 (1974) 296-300	306	94
TSUJI T., TSUNEHISA S., YAMAMOTO K., OSAWAX T. 1983, in the Proceedings of the VIIth INternational Symposium on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNBLAD A., SVENSSON S. (Eds.), Lund-Ronneby, 188-189	30	12
TUDDENHAM E.G.D., TRABOLD W.C., COLLINS J.A., HOYER L.W. J. Lab. Clin. Med., 93 (1979) 40-53	331	95
TULSIANI D.R.P., OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem., 252 (1977) 3227-3233	102	29
TULSIANI D.R.P., TOUSTER O. J. Biol. Chem., 258 (1983) 7578-7585	108	30
VAN BEEK W.P., SMETS L.A., EMMELOT P. Cancer Res., 33 (1973) 2913-2922	212	52
VAN BEEK W.P., SMETS L.A., EMMELOT P. Nature, 253 (1975) 457-460	213	52
VAN BEEK W., VERNOLE P., NERI G. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 19 (1983) 553-559	231	56
VAN BRUGGEN E.F.J., SCHUTTER G., VAN BREEMEN J.F.L., BIJHOLT M.M.C., WICHERTJES T. 1981, in Electron Microscopy of Proteins, HARRIS, J.R. (Ed.), Academic Press, London, 1-38	278	70
VAN DEN EIJNDEN D.H., JOZIASSE D.H., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., SCHMID K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 (1980) 839-845	111	30
VAN HALBECK H., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J. Biochim. Biophys. Acta, 675 (1981) 293-296	53 85 295	17 23 86
VAN HOLDE K.E., MILLER K.I. Q. Rev. Biophys., 15 (1982) 1-129	285	71
VAN KUIK J.A., VAN HALBEEK H., KAMERLING J.P. VLIEGENTHART J.F.G. 1984, in the Abstracts of the XIIth International Carbohydrate Symposium, VLIEGENTHART J.F.G., KAMERLING J.P., VELDING G.A. (Eds.), Vonk Publishers, Utrecht, 430	287	71

	Références	Pages
VEHAR G., DAVIE E. Biochemistry, 19 (1980) 401-410	345	120
VLIEGENTHART J.F.G., VAN HALBEEK H., DORLAND L. Pure Appl. Chem., 53 (1981) 45-77	276	69
VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H. Adv. Carb. Chem. Biochem., 41 (1983) 209-374	277	69
WANG F.F.C., HIRS C.H.W. J. Biol. Chem., 252 (1977) 8358-8364	128	35
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69 (1972) 1838-1842	220	53
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A., WALBORG, Jr, E.F. Miami Winter Symposium, 8 (1974) 1-16	206	50
WARREN L., BUCK C.A., TUSHYNSKI G.P. Biochim. Biophys. Acta, 516 (1978) 97-127	201 207 208 209 230	49 50 51 51 56
WASNIOWSKA K., DRZENIEK Z., LISOWSKA E. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76 (1977) 385-390	141	39
WATKINS W.M. Science, 152 (1966) 172-181	1	7
WEISS H.J., TSCHOPP T.B., BAUMGARTNER H.R. N. Engl. J. Med., 293 (1975) 619-623	307	94
WERNER I., ODIN L. Acta Soc. Med. Upsaliensis, 57 (1952) 230	271	39
WIELAND F., DOMPERT W., BERNHARDT G., SUMPER M. FEBS lett., 120 (1980) 110-114	45	15
YAMAGUCHI H., IKENAKA T., MATSUSHIMA Y. J. Biochem., 70 (1971) 587-594	9	8
YAMASHINA I., MAKINO M. J. Biochem, 51 (1962) 359-364	48	15
YAMASHITA K., TACHIBANA Y., KOBATA A. J. Biol. Chem., 253 (1978) 3862-3869	83	22
YAMASHITA K., KAMERLING J.P., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 3099-3106	57 74	17 20
YAMASHITA K., LIEDA M., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 14144-14147	84	22

	Références	Pages
YAMASHITA K., OHKURA T., TACHIBANA Y. TAKASAKI S., KOBATA A. J. Biol. Chem., 259 (1984) 10834-10840	223 366 367	54 154 155
YOSHIMA H., FURTHMAYR H., KOBATA A. J. Biol. Chem., 255 (1980) 9713-9718	87	23
YOSHIMA H., TAKASAKI S., KOBATA A. J. Biol. Chem., 255 (1980) 10793-10804	73	20
YOSIZAWA Z., SATO T., SCHMID K. Biochim. Biophys. Acta, 121 (1966) 417	**248**	**62**
ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G. J. Chromatogr., 69 (1972) 291-304	272	68

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

RESUME DE THESE

La compréhension du rôle biologique des glycannes des glycoprotéines passe par la connaissance de leurs structures primaires ce qui nécessite l'utilisation de méthodologies adaptées. Nos travaux s'inscrivent dans cette thématique de recherches et ont été dirigés, dans un premier temps, vers la mise au point de microméthodes de libération quantitative des glycannes des N-glycosylprotéines (hydrazinolyse/N-réacétylation) et de séparation et de comparaison de leurs structures primaires.

Nous avons ensuite appliqué notre méthodologie à des glycoprotéines d'intérêt biologique majeur, mais disponibles en faible quantité. Grâce à l'application des techniques classiques de méthanolyse, de méthylation couplée à la spectrométrie de masse et d'analyse de résonnance magnétique nucléaire du proton, nous avons déterminé les structures complètes des glycannes majeurs de type N-glycosidique du fibrinogène bovin, de l'hémocyanine du scorpion Androctonus australis, d'IgM humaines normales et pathologiques et du facteur VIII/facteur de von Willebrand. Les principales conclusions qui se dégagent de ces résultats sont de trois ordres. Premièrement, on assiste à une simplification structurale des glycannes chez les Invertébrés. Deuxièmement, à côté du glycanne majeur du F VIII/vWF, nous avons identifié 9 glycannes mineurs de type N-glycosidique, cette grande hétérogénéité structurale posant le problème de la participation de ces oligosaccharides dans le mécanisme de l'hémostase. Troisièmement, nous avons mis en évidence des différences uniquement quantitatives entre les glycannes des IgM normales et pathologiques.

Nous avons également appliqué notre méthodologie à l'étude comparative des glycannes de type oligomannosidique de fibroblastes normaux et transformés par un virus oncogène. Les différences observées étaient encore d'ordre quantitatif : les glycoprotéines des cellules transformées étaient enrichies en glycannes oligomannosidiques les plus lourds. L'explication biologique de tels phénomènes demeure encore inconnue.