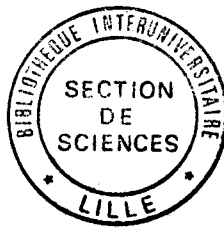


50376  
1988  
197

N° D'ORDRE : 288



50376  
1988  
197

**THESE**

présentée à  
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES-ARTOIS  
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par

Calliope KEPHALIANOS-CAPON

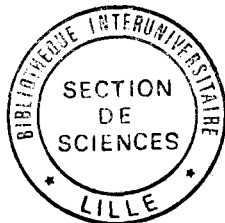
**ETUDE DE L'ANTIGENE DE GROUPE Sd<sup>a</sup>  
DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES.  
DETERMINATION STRUCTURALE  
D'OLIGOSACCHARIDES O-GLYCOSYLES  
ISOLES DU MECONIUM.**

Présentée le 21 Décembre 1988 devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : J-P. CARTRON  
Rapporteur : M. LHERMITTE  
Examineur : B. FOURNET  
Examineur : G. STRECKER



50376  
1988  
197



50376  
1988  
197

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur B. FOURNET dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n°217: Relations structure-fonctions des constituants membranaires - Directeur: Monsieur le Professeur J. MONTREUIL).

A Monsieur le Professeur J. Montreuil

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre Laboratoire où j'ai eu le plaisir de réaliser ce travail, dans une atmosphère de haute compétence scientifique.

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

A Monsieur J.-P. Cartron, Directeur de Recherches au CNTS

Au cours de mes passages au CNTS, j'ai pu apprécier votre dynamisme, votre compétence scientifique et la chaleur de votre accueil ainsi que celle de votre équipe.

Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette Thèse.

Soyez en remercié et assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. Lhermitte

Ta présence dans ce Jury témoigne de l'intérêt que tu as bien voulu accorder à nos recherches. Je t'en suis reconnaissante et tiens à t'exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur G. Strecker, Directeur de Recherches au CNRS

Je suis heureuse de te compter parmi les membres de ce Jury. Ta compétence scientifique et ta disponibilité permanente n'ont rien à envier à ta simplicité et à ton humour sans égal. Je ne saurais, par ailleurs oublier, que c'est grâce au "matériel" que tu m'as fourni que j'ai pu mener à bien une partie de ce travail.

A Monsieur le Professeur B. Fournet

Vous m'avez accueillie dans votre équipe de Recherches où l'ambiance chaleureuse et la bonne humeur que vous y faites régner, m'ont permis de m'intégrer rapidement. Au cours de ces années de travail, votre sollicitude et votre optimisme naturel m'ont apporté un soutien moral inappréciable dans les moments difficiles et pleins de doutes qui jalonnent le chemin de la Recherche.

Je vous en remercie et permettez-moi de vous assurer de ma profonde gratitude et de mon amitié.

Qu'il me soit permis de remercier Yves, Timm., Ossarath, Patrick, Thierry, "petit" Thierry, Franck, Zhu et tous les autres, sans qui le "107", ne serait pas ce qu'il est.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Célen, Catherine, et Christine pour l'élaboration de ce manuscrit et pour l'aide qu'elles ont pu m'apporter ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué à l'ambiance chaleureuse du C-9.

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Fuc	:	L-fucose
Gal	:	D-galactose
Man	:	D-mannose
GlcNAc	:	N-acétyl-D-glucosamine
GalNAc	:	N-acétyl-D-galactosamine
GalNAc-ol	:	N-acétyl-D-galactosaminitol
NeuAc	:	acide-N-acétylneuraminique
GDP	:	guanosine-diphosphate
UDP	:	uridine-diphosphate
CMP	:	cytosine-monophosphate
Ser	:	sérine
Thr	:	thréonine
Cer	:	céramide
LacCer	:	lactosylcéramide
SSEA-1	:	stage-specific embryonic antigen
EGF	:	epidermal growth factor
RER	:	reticulum endoplasmique rugueux
SDS	:	sodium dodécylsulfate
Mn	:	manganèse
HPLC	:	chromatographie liquide haute performance
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
FAB-MS	:	fast-atom bombardment mass spectrométrie

**TABLE DES MATIERES**

# INTRODUCTION

## GENERALITES

I - INTRODUCTION	5
II - LES STRUCTURES GLYCANNIQUES DES PROTEINES ET LIPIDES	6
A - <u>Les glycoprotéines</u>	6
A - 1 : Les N-glycannes	7
A - 2 : Les O-glycannes	8
B - <u>Les glycolipides</u>	8
B - 1 : Les glycosphingolipides neutres	9
B - 2 : Les glycosphingolipides acides	9
C - <u>Les polylactosaminoglycannes</u>	9
III - BIOSYNTHESE DES CHAINES O-GLYCANNIQUES	12
A - <u>Biosynthèse et régulation</u>	12
A - 1 : Etape du déclenchement de la glycosylation	12
A - 2 : Allongement des chaînes O-glycanniques	14
A - 3 : Transfert des monosaccharides terminaux	15
A - 3.1 : <u>Les glycosyltransférases de groupes sanguins</u>	
A - 3.2 : <u>Les sialyltransférases</u>	20
B - <u>Localisation des différents sites de glycosylation</u>	20
B - 1 : Localisation du site de déclenchement de la glycosylation	23
B - 2 : Localisation des glycosyltransférases responsables de l'allongement des O-glycannes	24
IV - LES SYSTEMES DE GROUPES SANGUINS	29
A - <u>Le système de groupe sanguin I/i</u>	31



<b>B - <u>Les déterminants de groupes sanguins des cellules érythrocytaires</u></b>	32
<b>C - <u>Les déterminants des groupes sanguins au niveau des mucines</u></b>	33
C - 1 : <b>Le noyau oligosaccharidique commun</b>	34
C - 2 : <b>Le squelette</b>	35
C - 3 : <b>La région périphérique</b>	35
<b>V - <u>ROLE DES ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS</u></b>	35
<b>A - <u>Importance de la glycosylation</u></b>	35
<b>B - <u>Glycosylation associés aux tumeurs</u></b>	36
B - 1 : <b>Modifications rencontrés dans les glycolipides</b>	36
B - 1.1 : <u>La synthèse bloquée</u>	36
B - 1.2 : <u>La synthèse spécifique des cellules transformées</u>	37
B - 1.3 : <u>Passage des glycolipides d'une série à une autre série</u>	37
B - 1.4 : <u>Modification de l'organisation glycolipidique des membranes</u>	37
B - 2 : <b>Modifications intervenant dans les glycoprotéines</b>	39
B - 1.1 : <u>Les N-glycosylprotéines</u>	39
B - 1.2 : <u>Les O-glycosylprotéines</u>	40
<b>C - <u>Les antigènes: marqueurs cellulaires</u></b>	40
C - 1 : <b>Les antigènes glycaniques associés à la différenciation</b>	41
C - 1.1 : <u>Les antigènes basés sur la structure de type I</u>	41
C - 1.2 : <u>Les antigènes basés sur la structure de type II</u>	42
C - 2 : <b>Les antigènes: marqueurs de cellules tumorales</b>	43
C - 2.1 : <u>L'antigène X dans les glycolipides</u>	43
C - 2.2 : <u>L'antigène X dans les glycoprotéines</u>	44
C - 2.3 : <u>Conclusions</u>	46
<b>D - <u>Les anticorps monoclonaux</u></b>	46
D - 1 : <b>Les oligosaccharides des glycoprotéines: antigènes majeurs des cellules entières</b>	47
D - 2 : <b>Les oligosaccharides, antigènes majeurs de glycoprotéines</b>	51

<b>VI - BASES GENETIQUES DE LA GLYCOSYLATION</b>	54
A - <u>Relation gène-enzyme</u>	54
B : <u>Philogénie des antigènes ABH</u>	56
C - <u>Les enzymes, sous contrôle des gènes H et Se</u>	56
D - <u>Les antigènes Lewis</u>	58
E : <u>Les antigènes X et Y</u>	58
<b>VII - LES ANTIGENES Cad ET Sd<sup>a</sup></b>	59
A - <u>L'antigène Cad</u>	59
B - <u>Le système Sid</u>	61
B - 1 : Diverses sources d'antigènes Sd <sup>a</sup>	61
B - 2 : <u>La glycoprotéine de Tamm-Horsfall et les mucines urinaires</u>	
B - 2.1 : <u>La glycoprotéine de Tamm-Horsfall (T-HG)</u>	62
B - 2.2 : <u>Les mucines urinaires</u>	62
B - 3 : Différentes structures intervenant dans l'antigénicité Sd <sup>a</sup>	

## **TRAVAUX PERSONNELS**

<b>INTRODUCTION</b>	67
<b>I - LA GLYPHORINE A</b>	67
A - <u>Nomenclature</u>	67
B - <u>Description</u>	68
C - <u>Caractérisation des glycophorines Cad et Sd<sup>a</sup></u>	68
C - 1 : Isolement et spécificité	68
C - 2 : Les chaînes oligosaccharidiques isolées de la glycophorine de sujets Cad	69

D - Comparaison des chaînes O-glycosidiques de la glycophorine A provenant d'érythrocytes de groupe Sd(a-), Sd(a+) et Cad	69
E - Conclusions	72
II - LES MUCINES URINAIRES	74
A - <u>Introduction</u>	74
B - <u>Matériels et méthodes</u>	
B - 1 : Préparation de la mucine	74
B - 2 : Hydrolyse alcaline des chaînes glycaniques	74
B - 3 : Purification des oligosaccharide-alditols	75
B - 4 : Tests d'agglutination par les lectines et les anticorps	75
B - 5 : Composition molaire en monosaccharides	76
C - <u>Resultats</u>	76
III - LES MUCINES MECONIALES	
A - <u>Introduction</u>	78
B - <u>Fractionnement des oligosaccharide-alditols obtenus par β-élimination du méconium</u>	79
C - <u>Structure primaire des oligosaccharide-alditols majeurs obtenus par β-élimination du méconium</u>	81
D - <u>Etude des fractions glucidiques lourdes obtenues après hydrolyse alcaline du méconium</u>	82
D - 1 : Matériels et méthodes	82
D - 2 : Résultats et discussion	82
E - <u>Conclusions</u>	85

## CONCLUSIONS GENERALES

I N T R O D U C T I O N

Les progrès les plus importants dans la connaissance des glycoconjugués de la membrane érythrocytaire, porteurs des antigènes de groupes sanguins sont venus de la collaboration des biochimistes et des immunogénéticiens.

Leur rôle dans la membrane du globule rouge, les apports récents de la biochimie dans la connaissance des groupes sanguins, la différenciation, la maturation et le vieillissement cellulaire, l'intérêt des modèles offerts par la pathologie, soulèvent beaucoup de problèmes d'un intérêt très général en biologie cellulaire.

Les groupes sanguins sont les marqueurs de certaines molécules de la membrane cellulaire. Du fait de leurs structures différentes (certains ne sont pas des glycoconjugués), ils représentent un ensemble très hétérogène. En outre, certains sont limités au tissu hématopoïétique (Rh, Kell, Duffy, Kidd) alors que d'autres sont des groupes sanguins à très large distribution tissulaire comme i, I, H, A et B.

La détermination structurale des antigènes de groupe sanguin permettra de résoudre les mécanismes de leur biosynthèse. De plus, l'utilisation des déterminants antigéniques obtenus soit par synthèse osidique, soit par détachement de la partie protéique ou lipidique, s'avère indispensable dans les expériences d'inhibition d'anticorps monoclonaux pour définir les épitopes ou comme substrats pour l'analyse des activités des glycosyltransférases.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre de la thématique du Laboratoire "Relations structure-fonction des constituants membranaires" et font suite aux travaux de Herkt (1983) et de Cache (1986).

Nous présenterons dans un chapitre de Généralités, l'état actuel de nos connaissances sur la biosynthèse des O-glycannes, le rôle et l'importance des déterminants de groupes sanguins, et les antigènes Cad et Sd<sup>a</sup>.

Nous présenterons ensuite nos travaux personnels relatifs à la détermination structurale de l'antigène de groupe sanguin Sd<sup>a</sup>, d'abord dans le sang puis dans différents tissus : les mucines urinaires et les mucines méconiales. Ces dernières mucines représentent une importante source d'antigènes foetaux, ce qui nous a permis d'isoler d'autres substances à activité de groupe sanguin, caractérisées jusqu'à présent, dans les tissus foetaux et dans certains tissus tumoraux.

En effet, dans les cellules transformées par virus, ou dans les cellules cancéreuses, de nouvelles structures apparaissent à la surface cellulaire. Certaines de ces structures sont identiques, aux glycanes isolés du méconium : il en est ainsi pour l'activité antigénique X, abondante dans le méconium et que l'on rencontre notamment dans de nombreux glycanes de cellules cancéreuses.

Ce travail a fait l'objet des communications et publications suivantes :

**Communications :**

- 1 - O-linked glycans from glycophorin A of human Cad, Sd(a+) and Sd(a-) erythrocytes.  
CAPON, C., BLANCHARD, D., LEROY, Y., CARTRON, J.-P. and FOURNET, B.  
Proceedings of the VIIIth International Symposium on Glycoconjugates, Houston, Texas, 8-13 September 1985.
  
- 2 - Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins.  
CAPON, C., CACHE, P., LEROY, Y., WIERUSZESKI, J-M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. and FOURNET, B.  
Proceedings of the IXth International Symposium on Glycoconjugates, Lille, France, 6-11 July 1987, A97.
  
- 3 - Structures of 19 O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins.  
CAPON, C., LEROY, Y., WIERUSZESKI, J-M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. and FOURNET, B.  
Symposium on Mucus and Related Topics, University of Manchester, 24-29 July 1988.

**Publications**

- 1 - Comparative study of glycophorin A derived O-glycans from human Cad, Sd(a+) and Sd(a-) erythrocytes.  
BLANCHARD, D., CAPON, C., LEROY, Y., CARTRON, J.-P. and FOURNET, B.  
(1985) Biochem. J. 232, 813-818.

- 2 - Isolation of the major O-glycosidically linked oligosaccharides obtained by alkaline borohydride degradation of human meconium glycoproteins.

CAPON, C., CACHE, P., LEROY, Y., STRECKER, G., MONTREUIL, J.  
and FOURNET, B.

(1988) J. Chromatogr. Biomed. Appl. 425, 35-45

- 3 - Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins.

CAPON, C., LEROY, Y., WIERUZESKI, J.-M., RICART, G., STRECKER, G.,  
MONTREUIL, J. and FOURNET, B.

Soumis à Eur. J. Biochem.



**G E N E R A L I T E S**

## I - INTRODUCTION

Protéines et glucides furent longtemps considérés comme deux classes distinctes de produits naturels, ainsi de nombreuses tentatives furent entreprises pour débarrasser d'une part les protéines de leurs "impuretés" glucidiques et d'autre part, les "impuretés" protéiques des polysaccharides. Par la suite, il fût établi que des fractions glucidiques appelées glycannes étaient conjuguées soit à des protéines pour former la classe des glycoprotéines soit à des lipides pour former la classe des glycolipides.

Les glycoprotéines représentent l'un des groupes les plus diversifiés de composés biologiques que l'on retrouve dans presque tous les organismes vivants. Elles assurent des fonctions physico-chimiques et biologiques importantes dans la cellule : rôle dans la solubilité et la viscosité des protéines, stabilisation de la conformation des protéines, protection contre les protéolyses ...

La structure des glycoprotéines et de leurs unités oligosaccharidiques ont donné lieu à de nombreuses revues générales (Gottschalk, 1972; Zinn et al., 1977; Schachter, 1978; Kornfeld et Kornfeld, 1980; Sharon et Lis, 1982; Horowitz, 1982; Hughes, 1983; Ivatt, 1984; Montreuil, 1982, 1984).

Les glycoconjugués s'observent dans les cellules sous forme soluble ou liés aux membranes, aussi bien dans la matrice intracellulaire que dans les liquides extracellulaires. Ils se présentent sous diverses formes moléculaires linéaires ou branchées; l'ensemble représente une véritable forêt enracinée dans la membrane elle-même. C'est à l'extrémité de ces chaînes saccharidiques que se trouvent divers types de récepteurs (Cartron et al., 1983):

- Les antigènes de groupes sanguins. Ceux-ci peuvent être qualifiés de récepteurs pour leurs anticorps respectifs: les cellules hématopoïétiques, par exemple, sont reconnues par des antigènes oligosaccharidiques tels les antigènes X, Y et ABH(O) (Watkins 1979; Finne, 1980).

- Les récepteurs de reconnaissance de certaines cellules "cibles", de microorganismes pathogènes, de toxines et de virus (Finne, 1984; Loomes et al., 1984; Koscielak, 1986; Suzuki et al., 1986). Les glycoprotéines virales qui forment des aspérités à la surface des virus, sont essentielles à l'infection. Elles sont impliquées dans la "liaison" avec la cellule hôte et dans la fusion membranaire (Marsh, 1984).

- Les sites de reconnaissance pour des accepteurs de type "lectines" lors de la migration des glycoprotéines à travers la membrane (Haffar et al., 1986).

Les glycoconjugués possèdent aussi d'autres fonctions biologiques : ceux des membranes apparaissent très tôt au cours de l'embryogénèse. Ils peuvent servir de marqueurs dans la différenciation (Hakomori, 1981). La transformation des chaînes saccharidiques linéaires constituées d'unités de répétition, en structure branchée donne lieu à un des événements fondamentaux puisqu'il en résulte une capacité accrue d'élongation et d'arborescence.

## II - LES STRUCTURES GLYCANNIQUES DES PROTEINES ET DES LIPIDES

Tandis que de nombreuses questions restent posées sur la fonction des chaînes glycaniques des glycoconjugués et que la régulation de la synthèse de ces chaînes reste peu connue, la structure chimique de nombreuses chaînes oligosaccharidiques est élucidée.

La caractérisation complète de polysaccharides, glycolipides et glycoprotéines exige la purification et l'analyse structurale de leurs oligosaccharides respectifs. La détermination de ces structures implique la recherche de la composition molaire des sucres, du type de liaison, la configuration anomérique et la séquence des résidus glycaniques.

De nombreuses techniques, de plus en plus perfectionnées, ont pu être utilisées pour l'analyse structurale des glycoprotéines.

### A - Les glycoprotéines

Dans les glycoprotéines, les oligosaccharides sont liés à la protéine :

- par une liaison N-glycosidique

entre un résidu de N-acétylglucosamine et d'asparagine dans la plupart des N-glycosylprotéines et entre un résidu de glucose et d'asparagine dans les glycoprotéines isolées récemment de bactéries.

- par une liaison O-glycosidique

-entre sérine ou thréonine d'une part et l'un des monosaccharides suivants:

\* xylose dans les protéoglycannes excepté dans les kératanes sulfates

\* galactose dans le collagène de Lombricus et de Nereis ainsi que dans les glycoprotéines végétales

\* N-acétylgalactosamine dans de nombreuses mucines

\* mannose dans les mannanes de Saccharomyces cerevisiae, de Cryptococcus laurentii, de Penicillium melinii et de Torulopsis candida ainsi que dans le collagène de Nereis

\* fucose dans les glycopeptides de l'urine humaine dans tous les cas ces liaisons sont alcali-labiles.

-entre l'hydroxylysine et le galactose ou le disaccharide Glc( $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ - dans le tropocollagène de la peau de Cobaye et le collagène de la Seiche. Dans ce cas la liaison est alcali-stable.

#### A - 1 : Les N-glycannes

On distingue 3 grandes classes de N-glycannes :

- le type oligomannosidique ("high-mannose type")
- le type N-acétyllactosaminique ("complex type")
- des hybrides contenant des chaînes oligomannosidiques et des chaînes N-acétyllactosaminiques

Ces chaînes glycaniques ont un noyau oligosaccharidique commun de trois mannoses et de deux N-acétylglucosamines.

## A - 2 : Les O-glycannes

Les O-glycosylprotéines à N-acétylgalactosamine Ser/Thr peuvent être classées en 4 catégories selon la structure du noyau commun :

Type 1	Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-Ser/Thr
Type 2	Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-Ser/Thr
Type 3	GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-Ser/Thr
Type 4	GlcNAc( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-Ser/Thr

Sur ces motifs communs peuvent venir se greffer d'autres monosaccharides conduisant à des structures parfois très complexes de nature polylactosaminique, porteurs des déterminants de groupes sanguins. Cependant, il existe d'autres noyaux oligosaccharidiques plus rares :

- le noyau GalNAc( $\alpha$ 1-3)GalNAc-Ser/Thr isolé des mucines d'adénocarcinomes rectaux humains par Kurosaka et al. (1983), des glycoprotéines du méconium par Hounsell et al. (1985), et des mucines salivaires d'hirondelles (genre Collocalia) par Wieruszeski et al. (1987).

- le noyau Gal( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-6)]GalNAc-Ser/Thr isolé par Slomiany et al. (1984) des mucines gastriques humaines.

- le noyau GlcNAc( $\beta$ 1-6)GalNAc-Ser/Thr provenant des glycoprotéines du méconium humain (Hounsell et al., 1985). La glycosyltransférase responsable de cette synthèse n'a pas encore été isolée; il se pourrait que ce disaccharide provienne de la dégradation d'un oligosaccharide ayant un noyau oligosaccharidique de type 2 ou de type 4.

## B - Les glycolipides

On trouve également des oligosaccharides liés aux lipides, en particulier, les glycosphingolipides (GSL). Les GSL sont composés de sphingosine, d'acides gras et d'un seul glycanne. La partie sphingosine-acide gras, appelée céramide (Cer) constitue le pôle hydrophobe des GSL. 80 à 90 % d'entre eux sont localisés dans la

membrane plasmique (Klenk et Choppin, 1970; Gahmberg, 1971; Keenan et al., 1972). De nombreuses revues générales se rapportent à l'étude de la structure et à la classification des GSL (Wiegandt, 1971; Morell et Braun, 1972; Hakomori et al., 1981).

Nous distinguerons les GLS neutres et les GLS acides.

#### **B - 1 : Les glycosphingolipides neutres**

Les glycolipides les plus petits sont les monoglycosylcéramides ou cérébrosides. Ces glycolipides ne comportent qu'un seul résidu osidique. D'autres monosaccharides peuvent venir se greffer sur ce monosaccharide constituant des di-, tri-, tétraglycosylcéramides (Tableau I, p.10). Ces GSL neutres peuvent porter de longues chaînes glycaniques formées d'unités de répétition N-acétyllactosaminiques liées au lactosylcéramide. Appelés aussi polyglycosylcéramides, ils peuvent contenir jusqu'à 20 unités de répétition, être branchés sur les résidus Gal internes par des liaisons ( $\beta$ 1-6) et porter les déterminants de groupes sanguins ABO(H) (Watkins, 1966; Koscielak et al., 1973; Hanfland, 1975).

#### **B - 2 : Les glycosphingolipides acides**

Les GSL acides contiennent soit de l'acide sialique et forment dans ce cas, la classe des sialoglycosphingolipides ou gangliosides, soit du sulfate et forment alors la classe des sulfoglycosphingolipides ou sulfatides (Tableau I).

#### **C - Les polylactosaminoglycannes**

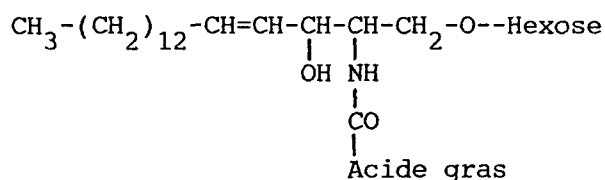
Les polylactosaminoglycannes font partie des N- et O-glycannes ainsi que des lipides. Les polylactosaminoglycannes linéaires, décrits par Niemann et al. (1978), du groupe sanguin actif i sont formés par l'action alternative de la  $\beta$ -4-galactosyltransférase et de la  $\beta$ -3-N-acétylglucosaminyltransférase (Basu et Basu, 1973; Presper et al., 1978; Van den Eijnden et al., 1983; Zielenski et Koscielak,

TABLEAU I

CLASSIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

LES GSL NEUTRES

La structure générale des glycosphingolipides est la suivante:

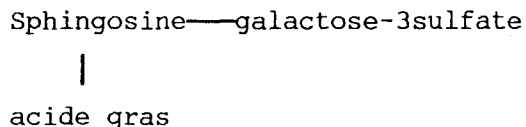


Leur classification est fondée sur la structure de la chaîne oligosaccharidique et l'on distingue par exemple:

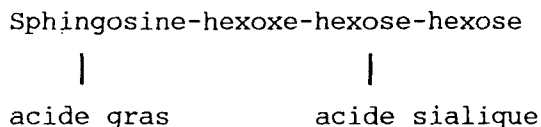
- \*Monoglycosylcéramides:
  - Glucosylcéramide Glcβ1-Cer
  - Galactosylcéramide Galβ1-Cer
- \*Diglycosylcéramides:
  - Lactosylcéramide (LacCer) Gal(β1-4)Glcβ1-Cer
- \*Triglycosylcéramides:
  - "Trihexoside" Gal(α1-4)LacCer
  - Glycolipide GA<sub>2</sub> GalNAc(β1-4)LacCer
- \*Tetraglycosylcéramides:
  - "Globoside" GalNAc(β1-3)Gal(α1-4)LacCer
  - Glycolipide GA<sub>1</sub> Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)LacCer
- \*Polyglycosylcéramides: [Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]<sub>n</sub>LacCer

LES GSL ACIDES

Les sulfatides: ce sont des esters sulfuriques de cérébrogalactosides



Les gangliosides:

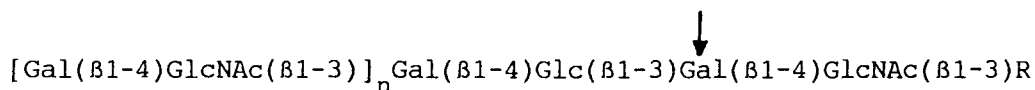


1983a; Yates et Watkins, 1983; Piller et Cartron, 1983; Basu et Basu, 1984).

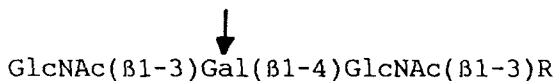
Les déterminants de groupe sanguin i peuvent se convertir en déterminant I. Une  $\beta$ -6-N-acétylglucosaminyltransférase lie un résidu GlcNAc en ( $\beta$ 1-6) d'un résidu galactose dans une chaîne polylactosaminique et forme ainsi un point de branchement. Ces enzymes de branchement ont été décrites dans le sérum humain (Zielenski et Koscielak, 1983a; Zielenski et Koscielak, 1983b), les cellules cancéreuses provenant des ascites de Novikoff (Van den Eijnden et al., 1983), la lymphe de Souris P-1798 (Basu et Basu, 1984) et les microsomes des mucines gastriques de Porc (Brockhausen et al., 1986).

La régulation de la biosynthèse de ces polylactosaminoglycannes branchés n'est pas encore tout à fait éclaircie. Théoriquement, un résidu GlcNAc peut être branché en ( $\beta$ 1-6) à un résidu Gal dans trois types de structures polylactosaminiques :

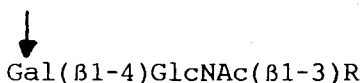
- Structure de type I contenant un galactose interne :



- Structure de type II contenant un galactose en pénultième position :



- Structure de type III contenant un galactose en position terminale :



Les biosynthèses des structures de type II et III ont été décrites par Piller et al. (1984) et par Van den Eijnden et al. (1983), respectivement. La biosynthèse de la structure de type I n'a pas été décrite à ce jour.

Pour Piller et al. (1984), le branchement a lieu au cours du processus d'allongement de la chaîne oligosaccharidique et dans un ordre



bien établi mettant en jeu trois enzymes : une première N-acétylglucosamine est d'abord transférée en C-3 d'un galactose terminal puis une seconde substitue le même résidu galactose en C-6. Le branchement précède l'allongement du disaccharide GlcNAc(β1-3)Gal par un résidu galactose lié en (β1-4) (Blanken et al., 1982).

Enfin le résidu GlcNAc lié en (β1-6) semble plus rapidement substitué par un résidu Gal que celui de la branche (β1-3) (Fig.1, p.13).

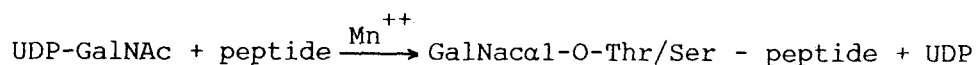
### III - BIOSYNTHESE DES CHAINES O-GLYCANNIQUES

Notre étude portant sur les O-glycannes de la glycophorine A, des mucines urinaires et des mucines gastrointestinales du nouveau-né, nous nous sommes, en conséquence, intéressés uniquement à la biosynthèse des enchaînements glucidiques des O-glycosylprotéines.

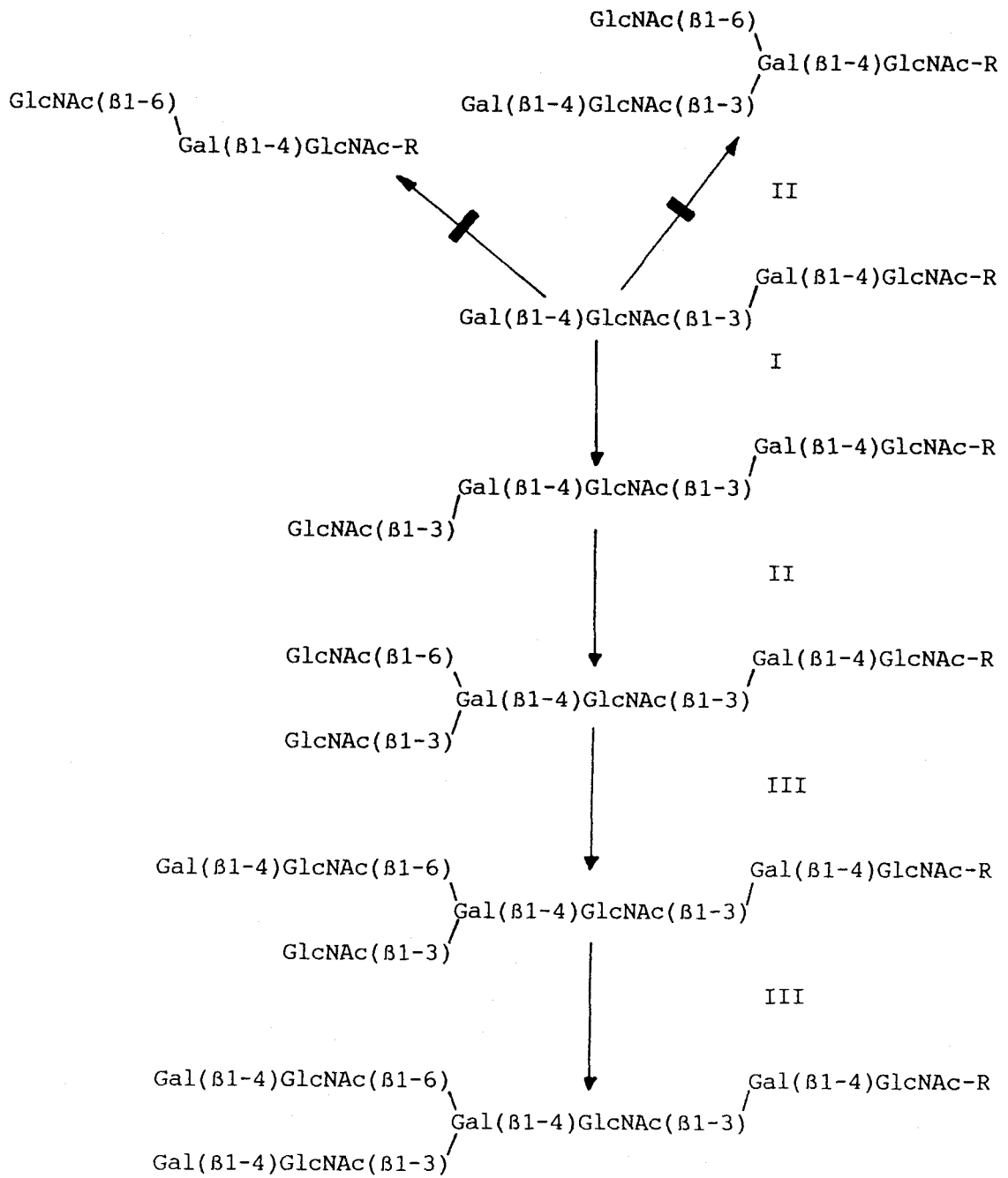
#### A - Biosynthèse et régulation

##### A - 1 : Etape du déclenchement de la glycosylation

La synthèse des chaînes O-glycanniques dérive d'un processus direct. Elle ne nécessite pas la présence préalable d'un précurseur oligosaccharidique associé à un lipide comme dans la synthèse des N-glycannes. L'étape initiale consiste en un simple transfert de GalNAc, à partir de l'UDP-GalNAc, sur un accepteur convenable de haut poids moléculaire portant une sérine ou une thréonine.



La liaison N-acétylgalactosamine(α1-O)Ser/Thr est caractéristique des mucines épithéliales et de toutes glycoprotéines de type "mucine". L'enzyme responsable du transfert est la polypeptide-(α1-O-Thr/Ser)N-acétylgalactosaminyltransférase, décrite pour la première fois par Mc Guire et Roseman (1967). Elle peut transférer la N-acétylgalactosamine soit sur la sérine, soit sur la thréonine d'un peptide accepteur.



**Fig.1** : Voie de biosynthèse des polylactosaminoglycannes branchés  
(Piller et al., 1984).

Les 3 enzymes impliquées dans la biosynthèse sont:

I: la (β1-3)-N-acétylglucosaminyltransférase

II: la (β1-6)-N-acétylglucosaminyltransférase

III: la (β1-4)galactosyltransférase

—|→ l'étape de synthèse ne peut avoir lieu

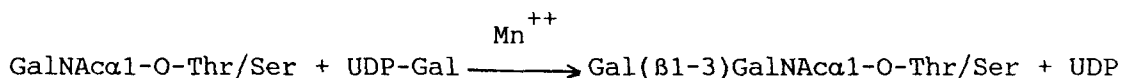
Cette activité enzymatique a depuis, été mise en évidence dans les glandes sous-maxillaires bovines (Hagopian et Eylar, 1968), humaines (Hearn et al., 1970) et porcines (Hill et al., 1977); le sérum humain, (Ko et Raghupathy, 1972); les mucus de la trachée (Baker et Sawyer, 1975) et de l'estomac, (Hearn et al., 1970); le cerveau de Rat, (Ko et Raghupathy, 1972); l'oviducte de Poule, (Hanover et al., 1980) et la glande mammaire ovine, (Soulhier et Gaye, 1981).

#### A - 2 : Allongement des chaînes O-glycanniques

Les additions ultérieures de résidus oligosaccharidiques dépendent avant tout des glycosyltransférases présentes dans les tissus (Beyer et al., 1979) et des nucléotides sucres disponibles tels : l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, l'UDP-GalNAc, le GDP-Fuc et le CMP-NeuAc.

Le galactose et la N-acétylglucosamine peuvent se trouver en position terminale sur certains oligosaccharides mais ils occupent habituellement des positions internes formant des unités structurales sur lesquelles viennent s'ajouter les sucres terminaux.

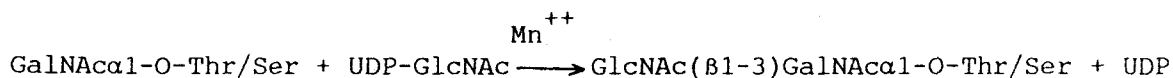
\* La N-acétylgalactosaminide(β1-3)galactosyltransférase.



Cette enzyme a été isolée pour la première fois par Schachter et al. (1971) des glandes maxillaires de Porc, puis de nombreux autres tissus. Lorsque le substrat accepteur est substitué par l'acide sialique en position C-6 de la GalNAc, l'enzyme reste sans action.

\* La N-acétylgalactosaminide(β1-3)-N-acétylglucosaminyltransférase.

Comme les N-glycannes, les structures O-glycanniques contiennent aussi des résidus GlcNAc. La transférase impliquée dans la synthèse des noyaux oligosaccharidiques de type 3 et de type 4 catalyse la réaction suivante:

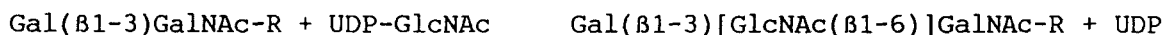


Elle est présente dans le côlon et l'estomac de Porc, de Rat et d'Homme (Brockhausen et al., 1985) et les tissus ovariens humains, (Yazawa et al., 1986). Comme la précédente, elle n'agit pas lorsque la GalNAc est sialylée en position C-6.

La figure 2 (p.16) donne les voies de biosynthèse des chaînes O-glycanniques de type "mucine".

\* La Galactosyl( $\beta$ 1-3)-N-acétylgalactosaminide( $\beta$ 1-6)N-acétylglucosaminyltransférase

Elle catalyse la réaction suivante :



Cette transférase impliquée dans l'allongement des chaînes O-glycanniques a été décrite pour la première fois dans les glandes sous-maxillaires canines (Williams et al., 1980; Williams et Schachter, 1980), dans l'épithélium de l'intestin grêle de Rat (Wingert et Cheng, 1984), les mucines trachéales bovines (Cheng et al., 1985), les tissus ovariens humains (Yazawa et al., 1986) et le côlon de Porc et de Rat (Brockhausen et al., 1985). Cette enzyme joue un rôle dans la synthèse des noyaux oligosaccharidiques de type 2 et 4.

Piller et al.( 1984) ont mis en évidence une ( $\beta$ 1-6)N-acétylglucosaminyl transférase dans les mucines gastriques de Porc, qui synthétise in vitro des polylactosaminoglycannes branchés. Cette enzyme peut aussi fonctionner lors de la synthèse des noyaux oligosaccharidiques de type 2 et 4.

Par contre la ( $\beta$ 1-3)-N-acétylglucosaminyltransférase impliquée dans la synthèse des noyaux oligosaccharidiques de type 3 et 4 des O-glycannes, diffère de la ( $\beta$ 1-3)glucosaminyltransférase responsable de la formation des polylactosaminoglycannes.

### A - 3 : Transfert des monosaccharides terminaux

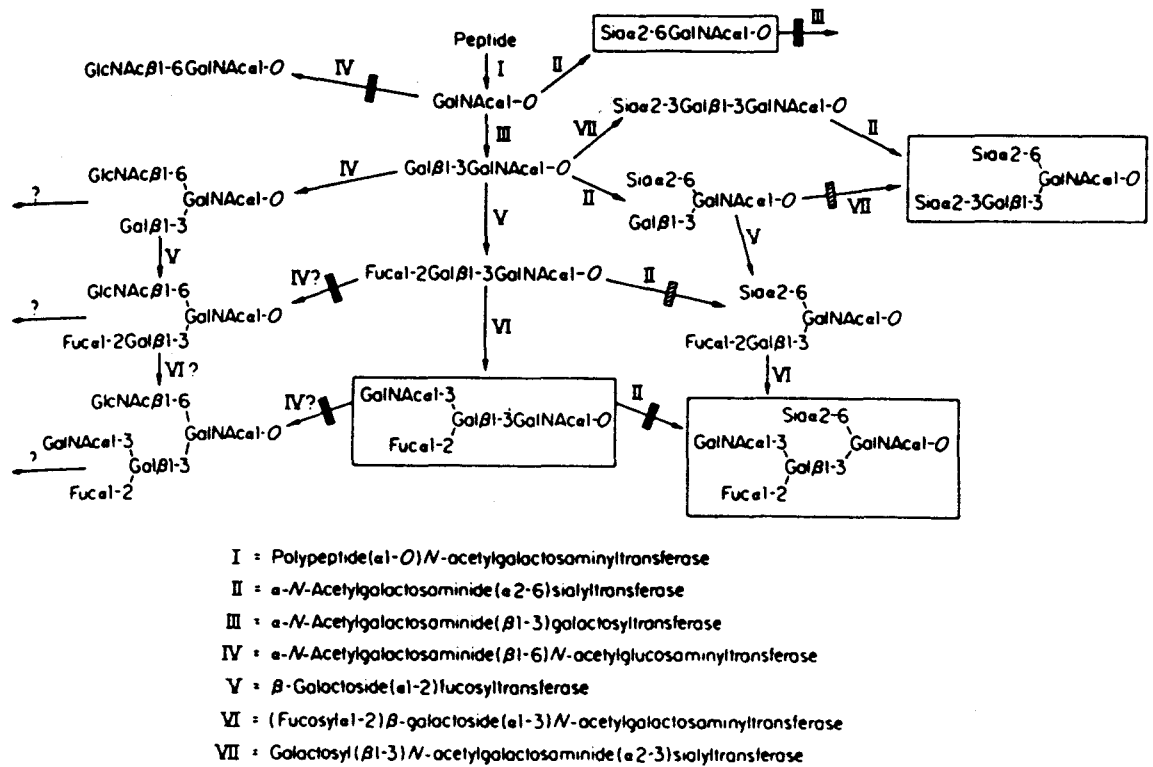


Fig.2: Voies de biosynthèse des chaînes O-glycanniques de type "mucine".  
 (d'après Sadler, 1984)

—■→ : étape de synthèse impossible  
 —▨→ : étape de synthèse lente.

Le fucose et l'acide sialique sont pour l'essentiel les sucres terminaux des chaînes oligosaccharidiques. Le fucose est impliqué dans 3 types de liaisons en position terminale non réductrice : liaisons ( $\alpha$ 1-2), ( $\alpha$ 1-3) et ( $\alpha$ 1-4) sur des résidus galactose et N-acétylglucosamine. L'acide sialique peut se conjuguer par des liaisons ( $\alpha$ 2-3) et ( $\alpha$ 2-6) sur les monosaccharides suivants: GalNAc, Gal, par une liaison ( $\alpha$ 2-4) sur la N-acétylglucosamine et pour certaines glycoprotéines comme celles du cerveau (J.Finne, 1975), par une liaison ( $\alpha$ 2-8) sur un résidu d'acide N-acétylneuraminique

La substitution des chaînes oligosaccharidiques par l'acide sialique interférant avec la substitution par des sucres neutres, les glycosyltransférases qui branchent les sucres terminaux sont classés en deux groupes selon Sadler (1984) :

- les glycosyltransférases de groupes sanguins qui forment les structures ABH et Lewis des érythrocytes humains et des mucines;
- et les sialyltransférases.

#### A - 3.1 : Les glycosyltransférases de groupes sanguins

##### \* La galactoside( $\alpha$ 1-3)-N-acétylgalactosaminyltransférase.

Cette enzyme fixe la GalNAc en ( $\alpha$ 1-3) sur les structures H des groupes sanguins et forme ainsi l'antigène A (Tableau II,p.18).

Cette transférase agit sur les structures H de type 1 et de type 2 et non sur les structures Lewis b.

##### \* La galactoside( $\alpha$ 1-3)galactosyltransférase

L'enzyme transfère le galactose par une liaison ( $\alpha$ 1-3) sur les structures H pour former l'antigène B. Elle a été isolée par Carne et Watkins (1977) et possède le même type de spécificité que la transférase de groupe sanguin A.

TABLEAU II

LES ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS

Antigène	Structure chimique
A	GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc-R Fuc(α1-2)
B	Gal(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc-R Fuc(α1-2)
H	Gal(β1-3/4)GlcNAc-R Fuc(α1-2)
Le <sup>a</sup>	Gal(β1-3)GlcNAc-R Fuc(α1-4)
Le <sup>b</sup>	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc-R Fuc(α1-4)
Sialyl-Le <sup>a</sup>	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc-R Fuc(α1-4)
X (SSEA-1)	Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α2-3)
Sialyl-X	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α1-3)
Y	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α1-3)
P <sub>1</sub>	Gal(α1-4)Gal(β1-4)GlcNAc-R
Cad	GalNAc(β1-4)Gal(β1-3)GalNAc-R NeuAc(α2-3) Neuc(α2-6)
Sd <sup>a</sup>	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal-R NeuAc(α2-3)

\* La  $\beta$  galactoside( $\alpha$ 1-2)fucosyltransférase

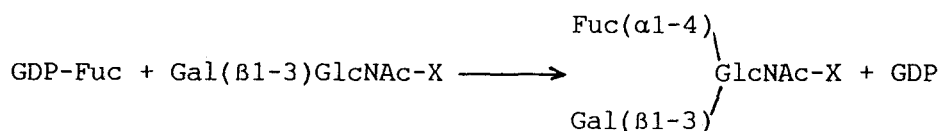
Elle catalyse la réaction suivante :



L'enzyme capable de synthétiser le déterminant H, a été décrite dans de nombreux tissus animaux et humains (voir revue générale de Beyer et al., 1981).

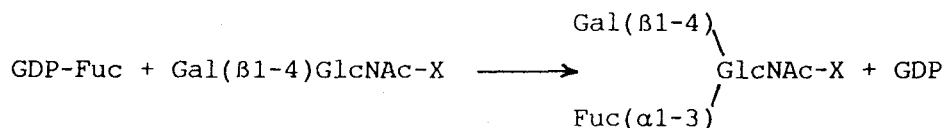
Alors que tous les individus expriment le déterminant H sur leurs érythrocytes, l'expression des glycoprotéines sécrétées est régulée par un gène sécréteur. Les individus, de phénotype sécréteur, possèdent donc le déterminant H sur leurs cellules rouges et leurs mucines gastrointestinales alors que les non-sécréteurs portent l'antigène H sur leurs érythrocytes et non sur leurs mucines (Race et Sanger, 1975a).

\* La N-acétylglucosaminide( $\alpha$ 1-4)fucosyltransférase



On trouve le déterminant Lewis a dans les oligosaccharides du lait, les mucines gastriques, les mucines de kystes ovariens et les glycoconjugués des membranes érythrocytaires. Le Lewis b porte un résidu fucosyl supplémentaire, lié en ( $\alpha$ 1-2) au galactose. Il est le produit, à la fois, de la Lewis ( $\alpha$ 1-2)fucosyltransférase et de la "H-spécific"( $\alpha$ 1-4)fucosyltransférase.

\* La N-acétylglucosaminide( $\alpha$ 1-3)fucosyltransférase



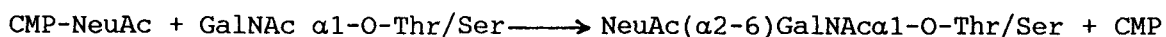


Cette fucosyltransférase utilise les chaînes de type 2 plutôt que celle de type 1.

### A - 3.2 : Les sialyltransférases

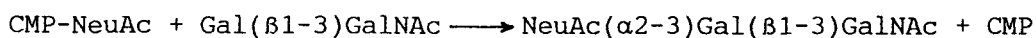
Nous décrivons les deux plus importantes sialyltransférases: les ( $\alpha$ 2-3) et ( $\alpha$ 2-6).

#### \* La N-acétylgalactosaminide( $\alpha$ 2-6)sialyltransférase



La liaison NeuAc( $\alpha$ 2-6)GalNAc se retrouve dans de nombreuses mucoprotéines épithéliales, les glycoprotéines de surface et les protéines plasmatiques. Jusqu'à ce jour, elle n'a été décrite que dans les O-glycannes et a été identifiée pour la première fois par Carlson et al. (1964) dans des extraits de glandes maxillaires.

#### \*La galactosyl( $\beta$ 1-3)-N-acétylgalactosaminide( $\alpha$ 2-3)sialyltransférase

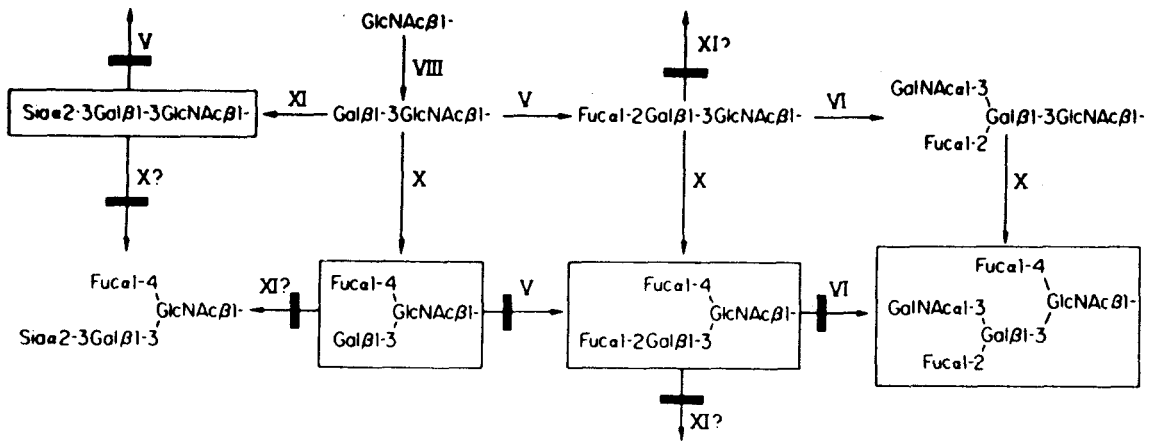


La liaison neuraminy( $\alpha$ 2-3)galactose, est présente dans la séquence NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc des glycoprotéines du sang et des membranes plasmatiques, dans la structure tétrasaccharidique : NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc, isolée de la fétuïne, de la glycophorine A et de nombreuses autres protéines.

L'activité de la galactoside( $\alpha$ 2-3)sialyltransférase sur différents substrats a été étudiée (Beyer et al., 1979). L'accepteur le plus utilisé pour cette enzyme est le disaccharide Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ 1-O-. Si le galactose se trouve fucosylé en ( $\alpha$ 1-2), l'activité enzymatique s'annule.

Nous avons résumé dans les figures 3 (p.21) et 4 (p.22) les voies de fin de synthèse des chaînes oligosaccharidiques de type 1 et de type 2, respectivement.

### B - Localisation des différents sites de glycosylation



- V :  $\beta$ -Galactoside ( $\alpha$ 1-2) fucosyltransferase
- VI : (Fucosyl $\alpha$ 1-2) $\beta$ -galactoside ( $\alpha$ 1-3)*N*-acetylgalactosaminyltransferase
- VIII :  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminide ( $\beta$ 1-3) galactosyltransferase
- X :  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminide ( $\alpha$ 1-4) fucosyltransferase
- XI : Galactosyl ( $\beta$ 1-3/4)*N*-acetylglucosaminide ( $\alpha$ 2-3) sialyltransferase

Fig.3 : Voies de fin de synthèse des chaînes oligosaccharidiques de type 1 (d'après Sadler, 1984).

—|→ : étape de synthèse impossible

—|/→ : étape de synthèse lente.

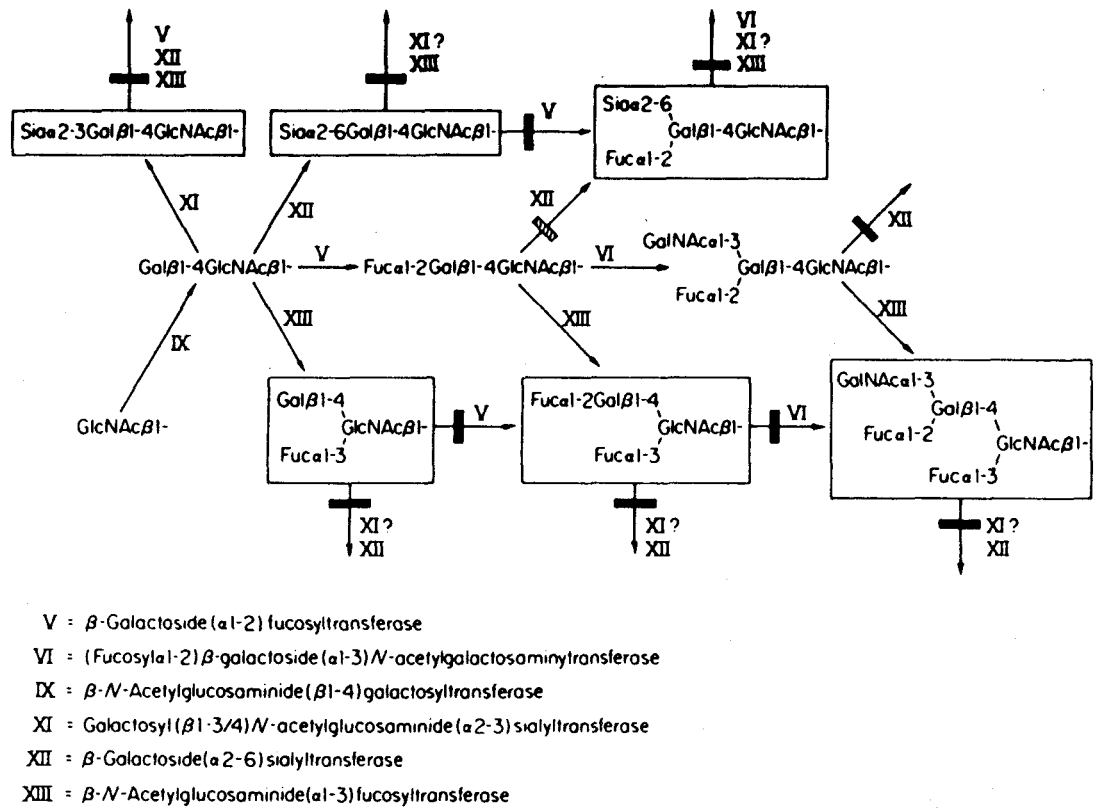


Fig.4 : Voies de fin de synthèse des chaînes oligosaccharidiques de type 2 (d'après Sadler, 1984)

—|→ : étape de synthèse impossible  
 -|→ : étape de synthèse lente.

## B - 1 : Localisation du site de déclenchement de la glycosylation

Alors que la biosynthèse de l'axe peptidique des glycoprotéines sécrétées s'effectue au niveau du reticulum endoplasmique rugueux (RER), la localisation du site de déclenchement de la glycosylation n'a pas été définitivement établie. Plusieurs sites cellulaires peuvent être concernés par le déclenchement de la glycosylation :

- Strous (1979) et Patzelt et Weber (1986) montrent, sur des mucines gastriques et pancréatiques de Rat, que la N-acétylgalactosamine est incorporée sur la protéine, de manière co-transcriptionnelle, au niveau du RER. C'est au niveau de ce même compartiment cellulaire des chondrocytes, que le xylose est incorporé sur la sérine des protéoglycannes (Hanover et al., 1980).

- Par contre, d'autres auteurs observent que le Golgi est bien le site de déclenchement de la glycosylation (Hanover et al., 1980; Niemann et al., 1982; Hanover et al., 1982; Cummings et al., 1983; Johnson et Spear, 1983, Thonar et al., 1983; Elhammer et Kornfeld, 1984; Jokinen et al., 1985; Lohmander et al., 1986; Nuwayhid et al., 1986).

\* Le fractionnement cellulaire par centrifugation montre que la polypeptide-N-acétylgalactosaminyltransférase est localisée essentiellement dans les membranes du Golgi du cerveau du Rat (Ko et Raghupathy, 1972), des mucines de l'intestin grêle du Rat (Kim et al., 1971), de l'oviducte de Poule (Hanover et al., 1980) et des glandes mammaires ovines (Soulier et Gaye, 1981).

\* La microscopie électronique confirme la localisation de la N-acétylgalactosamine dans le cis- et trans-Golgi des cellules caliciformes intestinales et non dans le reticulum endoplasmique (Roth, 1984).

De plus, dans le foie de Rat, l'UDP-GalNAc (Abeijon et Hirschberg, 1987) et l'UDP-Xyl (Nuwayid et al., 1986) sont transportés de leur site de synthèse : le cytosol, au Golgi, à des taux 2 à 6 fois supérieurs aux taux de transfert de l'UDP-GalNAc et l'UDP-Xyl, vers le reticulum endoplasmique.

Des études, réalisées par Roth et al. en 1986, sur l'épithélium intestinal humain, précisent la localisation cis-golgienne de l'enzyme responsable de la liaison avec le peptide.

Dans le même groupe, Deschuyteneer et al. (1988) étudient la localisation cellulaire de la chaîne polypeptidique non glycosylée appelée apomucine (MM:96.500) et de cette même chaîne glycosylée par la GalNac, dans les glandes sous-maxillaires porcines.

A l'aide d'anticorps préparés contre l'apomucine déglycosylée par voie enzymatique, complexée à la protéine A marquée à l'or, ces auteurs localisent l'apomucine dans le RER, dans des éléments de transition du reticulum endoplasmique et dans les vésicules situées du côté cis de l'appareil de Golgi.

De même, à l'aide de la lectine d'Helix Pomatia marquée à l'or colloïdal pour visualiser les résidus GalNac en position terminale non réductrice, ils localisent l'apomucine glycosylée par la GalNac, exclusivement dans le cis-Golgi.

Le médian-Golgi contient très peu de résidus GalNac liés à la lectine d'Helix Pomatia, excepté à son extrémité dilatée. Il est possible que les extrémités dilatées du médian-Golgi prennent part au transport de la mucine partiellement glycosylée du cis-Golgi vers le trans-Golgi.

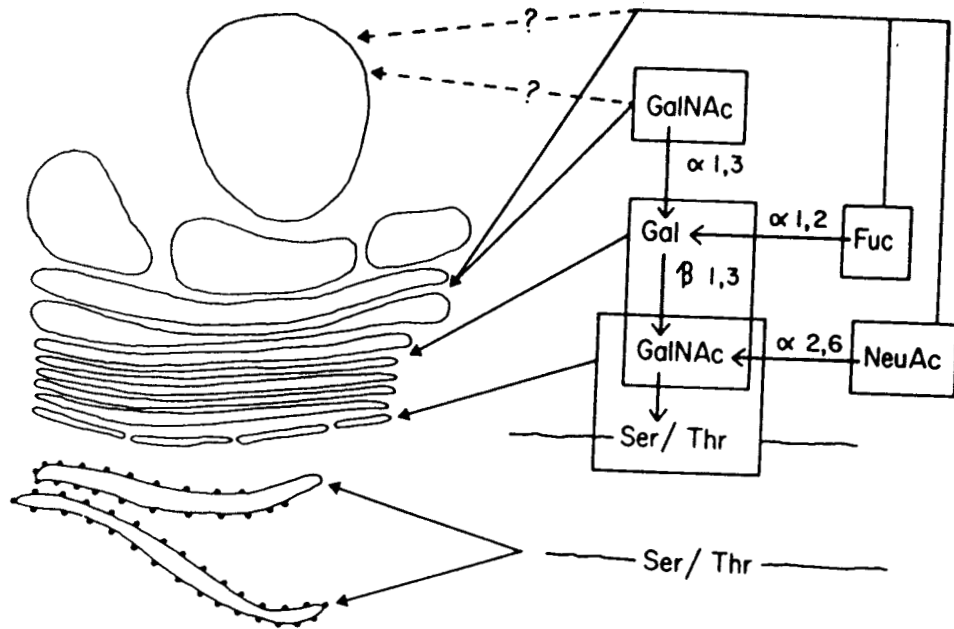
Par contre, le trans-golgi contient encore des résidus GalNac fixés à la lectine mais beaucoup moins que dans le cis-Golgi; ce qui suppose que le transfert de la GalNac sur l'apomucine soit achevé au niveau du trans-Golgi (Roth, 1984; Roth et al., 1986).

La répartition de l'apomucine et de la GalNac montre peu de recouvrement:

la glycosylation de la mucine commencerait donc bien de manière post-transcriptionnelle dans le Golgi plutôt que co-transcriptionnelle dans le RER (Fig.5, p.25)

## **B - 2 : Localisation des glycosyltransférases responsables de l'allongement des O-glycannes**

La glycosylation se poursuit par l'action séquentielle des glycosyltransférases. Leur localisation dans le cas de la O-glycosylation est moins connue que celle des enzymes de la N-glycosylation.



**Fig.5** : Schéma des différents sites cellulaires de la biosynthèse des chaînes O-glycanniques, dans les cellules de type "mucine" (Roth, 1987).

Les étapes finales de la glycosylation, intervenant éventuellement dans les structures éloignées des citernes du trans-Golgi, sont indiquées en pointillé.

Les résultats concernant la localisation des glycosyltransférases responsables de l'allongement des chaînes O-glycanniques ont été obtenus grâce à l'étude de l'action de la monensine sur la sécrétion des mucines glycosylées. On sait en effet que la monensine cause le ralentissement du transport des glycoprotéines vers la surface cellulaire (Tartakoff, 1983; Bartalena et Robbins, 1984; Ushida et al., 1980). Pour d'autres auteurs, elle inhibe ce transport (Strous et al., 1983). Dans tous les cas, son site d'action est le Golgi (Tartakoff et Vassali, 1977). On observe en effet dans le médian et le trans-Golgi des cellules traitées par la monensine (Strous et al., 1983), une accumulation de glycoprotéines.

La monensine affecte le "processing" de la biosynthèse des N-glycannes (Ledger et Tanzer, 1984). En ce qui concerne les O-glycannes, les résultats de l'action de la monensine sont moins probants. C'est ainsi qu'elle n'affecte pas le déclenchement ou l'allongement des chaînes O-glycanniques du proglucagon (Patzelt et Weber, 1986) alors qu'elle inhibe totalement l'addition des chaînes O-glycanniques dans les glycoprotéines de l'herpès (Johnson et Spear, 1983).

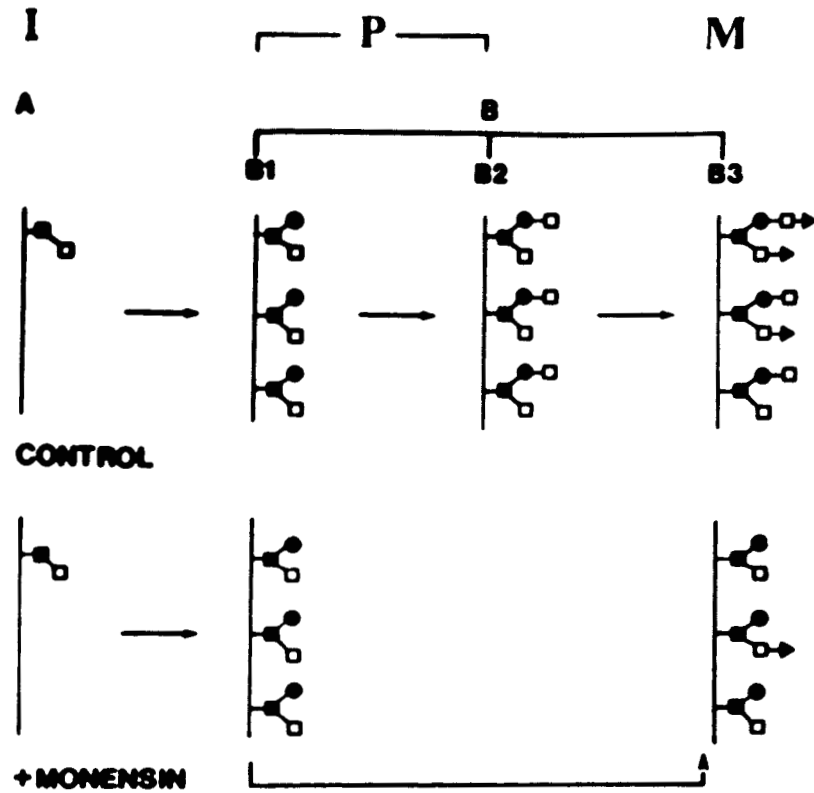
Les travaux les plus intéressants concernant la localisation des glycosyltransférases ont été publiés récemment par Spielman et al. (1988).

Ces auteurs proposent un modèle à plusieurs compartiments pour la localisation des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des sialomucines de cellules tumorales, provenant des ascites mammaires de Rat (ASPG-1 : Ascite sialoglycoprotein-1) :

le compartiment A dans lequel se trouve des formes immatures de l'ASPG-1.

Le compartiment B, divisé en sous compartiments B1 et B2, dans lesquels on trouve des formes prématures de l'ASPG-1 et le sous compartiment B3 où sont synthétisées les formes matures (Fig.6, p.27).

Le compartiment B<sub>1</sub> proche du site d'action de la monensine contient les transférases nécessaires à l'allongement ultérieur des chaînes O-glycanniques, en trisaccharides. En effet, la monensine n'affecte pas les glycosyltransférases de ce premier



**Fig.6:** Modèle de maturation de l'ASPG-1 (d'après Spielman et al., 1988).

I, P et M indiquent les oligosaccharides qui correspondraient aux formes immatures, prématures et matures de l'ASPG-1

Légende:

■ GalNAc, □ Gal, ● GlcNAc, ► NeuAc.



compartiment, les chaînes oligosaccharidiques étant identiques sur les cellules traitées et non traitées (Fig.6)

Le compartiment B<sub>2</sub>, sensible à l'effet de la monensine contient les (B1-4)galactosyltransférases et les sulfotransférases. Ceci est clairement démontré par l'absence d'oligosaccharides sulfatés et/ou à Gal(B1-4) terminal non réducteur.

Le compartiment B<sub>3</sub> renferme les sialyltransférases peu affectées par l'action de la monensine puisque des oligosaccharides sont capables de traverser le site d'effet de la monensine pour être sialylés dans ce dernier compartiment (Fig.6, p.27).

Cette sous-compartmentation des sialyl- et des galactosyltransférases, est démontrée par des études immunocytochimiques et par identification dans ces compartiments, d'activités enzymatiques distinctes. C'est ainsi que la galactosyltransférase se trouve dans le même compartiment que la thiamine pyrophosphatase et la sialyltransférase dans le compartiment qui contient la CMP phosphatase (Strous et Berger, 1985).

En conclusion, plusieurs voies de biosynthèse des O-glycannes sont actuellement proposées :

- Glycosylation co-transcriptionnelle du peptide naissant dans le RER (Strous, 1979; Bergh et al., 1983; Jokinen et al., 1985; Palzelt et Weber, 1986).

- Glycosylation post-transcriptionnelle dans le cis-Golgi, les enzymes d'élongation se répartissant dans trois compartiments du Golgi selon leur ordre d'action (Roth et al., 1986; Spielman et al., 1988). Roth et al. (1986) signalent cependant que certaines enzymes ne sont pas compartimentées.

Les études in situ, développées ces dernières années, ont permis d'éclairer certaines étapes de la biosynthèse, mais tout n'est

pas élucidé. L'organisation fonctionnelle de l'organelle complexe qu'est le Golgi, ne semble pas obéir à une règle générale mais dépendre du type de cellules. Les techniques du clonage, associées aux techniques immuno-chimiques contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse et de régulation des chaînes O-glycanniques au niveau des différents compartiments cellulaires.

#### IV - LES SYSTEMES DE GROUPES SANGUINS

Les glycolipides et les chaînes des N- et O-glycosylprotéines peuvent servir au transport des déterminants de groupes sanguins. Chez l'Homme, 21 systèmes de groupes sanguins sont au moins connus (Watkins, 1980). Ces spécificités sont déterminées par un motif glucidique généralement en position terminale non réductrice, rattaché aux chaînes glycanniques communes.

Quatre structures disaccharidiques terminales accrochées au motif polylactosaminique ont été décrites dans les glycoconjugués des érythrocytes humains et des glycoprotéines de sécrétion comme précurseurs d'antigènes ABH(O).

Type 1	Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -R
Type 2	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc $\beta$ -R
Type 3	Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -R
Type 4	Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc $\beta$ -R

Chacune de ces quatre chaînes peut acquérir l'antigénicité H par addition d'un résidu fucose en ( $\alpha$ 1-2) du galactose. Les déterminants antigéniques des systèmes ABH(O) et les structures de groupes sanguins qui leur sont affiliées, sont décrits dans le Tableau II (p.18).

Pour les systèmes ABH(O) et Lewis, la biosynthèse des antigènes est résolue (Fig.7, p.30) (Watkins, 1979; Finne, 1980; Watkins, 1980). Par une  $\alpha$ (1-3)-N-acétylgalactosaminyltransférase, une  $\alpha$ (1-3)galactosyltransférase et de nombreuses fucosyltransférases, les chaînes précurseurs sont converties en déterminant de groupe sanguin. La



synthèse de ces déterminants est sous contrôle génétique indirect. Ainsi, les gènes A, B, O ne sont pas responsables de la production directe des déterminants ABH(O). En fait, les gènes sont seulement responsables de la formation des enzymes qui transfèrent les oligosaccharides immunodominants externes, à la chaîne précurseur commune à tous les phénotypes (Le Pendu et al., 1983; Oriol et al., 1986).

#### A - Le système de groupe sanguin I/i

La chaîne porteuse des déterminants de groupe sanguin I/i a été décrite dans les glycoprotéines et les glycolipides des érythrocytes et autres types de cellules (Race et Sanger, 1975b; Krusius et al., 1978; Childs et al., 1979; Koscielak et al., 1979; Zdebska et al., 1980, 1983; Childs et al., 1983; Feizi, 1983; Hakomori, 1983a; Fukuda, 1985). Elle est constituée d'unités de répétition N-acétyllactosaminiques Gal(B1-4)GlcNAc(B1-3). Cette séquence disaccharidique est aussi celle de la chaîne précurseur de type 2 qu'il faut distinguer de son isomère Gal(B1-3)GlcNAc(B1-3) de type 1.

L'antigène i est le principal antigène érythrocytaire du foetus humain, diminuant après la naissance et durant la première année de vie, tandis que l'antigène I qui lui est associé, augmente. Cette augmentation pourrait s'expliquer par l'activité accrue de la  $\beta$ -6-N-acétylglucosaminyltransférase.

Cependant, dans les cellules embryonnaires de Souris, l'antigène I est décelé à un stade beaucoup plus précoce que l'antigène i au niveau des premières cellules différenciées, celles de l'endoderme primitif (Feizi, 1981; Gooi et al., 1981). Cet ordre d'apparition des structures branchées et linéaires, est l'inverse de celui des membranes des érythrocytes humains. Des glycosyltransférases d'origine maternelle peuvent contribuer dans l'oocyte, à la formation de ces structures branchées alors que les structures linéaires présentes au début de la différenciation représenteraient les premiers produits foetaux.

Les chaînes I/i peuvent porter des antigènes tel l'antigène X ou SSEA-1 "Stage-specific embryonic antigen", du nom du

premier anticorps monoclonal qui réagit avec sa structure (Feizi, 1983; Feizi, 1985). Dans les embryons de Souris, l'antigène X ou SSEA-1 : Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R apparaît au stade de la multiplication cellulaire 8 à 32 puis décline (Solter et Knowles, 1978). Quand l'antigène SSEA-1 diminue, le déterminant antigénique Y: [Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R apparaît. Cet antigène X est aussi un marqueur pour les adénocarcinomes du côlon humain (Hakomori et al., 1981).

On observe quelquefois une diminution des déterminants i et I lors du vieillissement des cellules alors que celles-ci les synthétisent encore. Cette disparition est en fait due au masquage des antigènes i/I par un groupement fucosyl ou N-acétylneuraminique (Feizi, 1981) ou un groupement sulfate (Mehmet et al., 1986; Tang et al., 1986).

Alors qu'un antigène peut se former lors de chaque addition d'un motif monosaccharidique, inversement, l'antigénicité de la structure sous-jacente peut être masquée. Chaque liaison nouvelle est formée par une glycosyltransférase spécifique. Selon l'activité relative de ces enzymes et la disponibilité des nucléotides sucres ou de l'accepteur oligosaccharidique, les proportions des différents motifs antigéniques varieront.

Réciproquement, une biosynthèse incomplète ou l'action de glycosidases peut mettre à jour un antigène caché qui "disparaît" ou "réapparaît" à différentes étapes de la différenciation ou de la transformation cellulaire (Mehmet et al., 1986).

Ainsi, il convient d'avoir à l'esprit que la présence de nouveaux antigènes à la surface des cellules n'est pas synonyme de biosynthèse de nouvelles protéines membranaires et qu'une perte d'antigénicité ne signifie pas obligatoirement l'absence de biosynthèse des oligosaccharides incriminés.

## **B - Les déterminants de groupes sanguins des cellules érythrocytaires**

Les érythrocytes du fœtus et du nouveau-né sont caractérisés par des glycanes lactosaminiques non branchés avec un

faible degré de fucosylation et un haut degré de sialylation. On y trouve peu de déterminants A, B, H. On observe 4 étapes importantes lors du développement des érythrocytes adultes :

- les chaînes linéaires i se convertissent en chaînes branchées I;
- diminution de la sialylation des polylactosaminoglycannes;
- augmentation de la fucosylation (fucose en  $\alpha$ 1-2 et  $\alpha$ 1-6);
- augmentation des structures branchées autres que polylactosaminiques.

Les oligosaccharides des glycoprotéines provenant des érythrocytes comme la glycophorine A sont bien connus (Yoshima et al., 1980; Gahmberg et al., 1984; Jokinen et al., 1985). Au cours de la maturation des cellules rouges, cette glycoprotéine augmente son taux de O-glycosylation (Gahmberg et al., 1984). Ses chaînes O-glycanniques ne possèdent pas de déterminants I/i actifs. Par contre, elle est responsable des spécificités M et N. Les travaux de Springer et Desai (1975) ont mis l'accent sur la nature oligosaccharidique du site antigénique. Cependant Prohaska et al. (1981) remarquent que la séquence en aminoacides des glycophorines portant les déterminants M et N, diffère au niveau de leurs résidus 1 et 5. Les aminoacides terminaux, responsables respectivement des spécificités M et N sont la sérine et la leucine. Pourtant, l'amidation des groupements neuraminyls (Lisowska et Wasniowska, 1978) ou l'action de neuraminidases (Lisowska et Wasniowska, 1978; Prohaska et al., 1981) provoquent la perte de l'activité MN vis à vis de nombreux sérums anti-MN. Les oligosaccharides ne déterminent pas la spécificité MN mais participent néanmoins au maintien de la configuration spatiale, facilitant l'adhésion de l'anticorps sur la sérine et la leucine terminale.

Le déterminant Cad est lui porté par les chaînes O-glycanniques de la glycophorine.

### C - Les déterminants de groupes sanguins au niveau des mucines

L'observation de Lehrs (1930) selon laquelle 75 % des individus excrètent des substances de groupes sanguins dans les milieux de sécrétion a facilité les recherches dans ce domaine. On distingue des antigènes solubles de nature glycoprotéique dans des milieux de sécrétion aussi variés que la salive, le lait, le liquide séminal, le méconium, le suc gastrique, l'urine, le liquide des sucs ovariens. La

structure antigénique de ces composés est identique à celle des antigènes érythrocytaires glycolipidiques (Hakomori et Strycharz, 1968).

Les mucines désignent des glycoprotéines de haute masse moléculaire sécrétées par des tissus épithéliaux divers. La plupart des études structurales portant sur les mucines ont été réalisées sur des glycoprotéines d'origine animale, en raison de la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de matériel humain.

On peut compter jusqu'à 200 chaînes liées par des liaisons O-glycanniques par 250 kilodaltons de glycoprotéines ( Hounsell et Feizi, 1982; Feizi et al., 1984) , soit environ 65 % de glycannes pour 100 g de matière sèche. Ces chaînes varient fortement par le nombre de monosaccharides qu'elles contiennent. Leur longueur peut évoluer au cours de la biosynthèse et des modifications intervenir sous l'effet de l'hydrolyse d'endoglycosidases.

En dépit de leur apparente complexité, leur biosynthèse est régie par des règles nombreuses et bien définies comme nous l'avons vu précédemment.

On définit 3 domaines structuraux et antigéniques distincts dans les mucines :

- le noyau oligosaccharidique commun,
- le squelette,
- la région périphérique.

#### C - 1 : Le noyau oligosaccharidique commun

Il compte quatre types de structure dont l'élément de base est toujours GalNAc-O-Ser/Thr. Ces structures communes à presque toutes les chaînes O-glycanniques ont été décrites précédemment.

La structure I: Gal(B1-3)GalNAc, constitue le déterminant de groupe sanguin T reconnu par PNL, la lectine de cacahuète ( Pereira et al., 1976).

La structure II exprime également ce déterminant:



### C - 2 : Le squelette

Le galactose et la N-acétylglucosamine constituent l'essentiel du squelette. Ils sont liés suivant deux types d'unités disaccharidiques au point de vue antigénique (Kabat et al., 1982; Gooi et al., 1983) et décrites précédemment par Watkins (1980).

Type I	Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc
Type II	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc

Cette région présente une très grande variété au niveau de la longueur du branchement et de l'antigénicité des chaînes. Dans les séquences linéaires, les unités disaccharidiques s'enchaînent par des liaisons (1-3) et les structures branchées sont formées par addition d'unités disaccharidiques en (1-6).

### C - 3 : La région périphérique

Les chaînes portent les antigènes des groupes sanguins principaux : H, A, B, Le<sup>a</sup> et Le<sup>b</sup> (Tableau II). La détermination de la structure de ces antigènes a été menée à bien par les études de Morgan, Watkins, Kabat et leurs collaborateurs (Watkins, 1980; Kabat et al., 1982), grâce aux glycoprotéines de type "mucine", en particulier, les glycoprotéines provenant de kystes ovariens riches en antigènes oligosaccharidiques.

D'autres antigènes moins connus, portés par l'extrémité terminale des chaînes glucidiques, tel l'antigène Sd<sup>a</sup>, ont également été décrits (Donald et al., 1983).

## V - ROLE DES ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS

### A - Importance de la glycosylation



Les changements dans la glycosylation des protéines et des lipides membranaires interviennent rapidement aux différents stades de la différenciation, du développement et de l'oncogénèse (Hakomori, 1981).

Plus de cent types de structures glycosylées ont été caractérisés dans les glycolipides et d'avantage dans les glycoprotéines. La glycosylation affecte la conformation, la localisation et l'organisation des protéines structurales et fonctionnelles du cytoplasme, des membranes et de la matrice extracellulaire.

La glycosylation des lipides membranaires donne des sites de reconnaissance cellulaires et permet la régulation de la fonction des protéines membranaires.

Une glycosylation anormale se traduit par la formation "d'antigènes associés aux tumeurs"; ceci a été démontré par l'étude des épitopes glycolipidiques. Des changements dans la composition et le métabolisme des glycolipides ont été observés non seulement dans les cellules transformées par voie chimique ou virale mais également dans de nombreux cancers humains (Hakomori, 1983b). De tels épitopes, permettant aussi de différencier les tissus normaux des tissus tumoraux ont été décelés dans les glycoprotéines.

## **B - Glycosylation associée aux tumeurs**

### **B -1: Modifications rencontrées dans les glycolipides**

Les glycolipides subissent 4 types de modification lors de la transformation cancéreuse (Hakomori, 1983b) :

La synthèse incomplète, la synthèse spécifique des cellules transformées, le passage des glycolipides d'une série à une autre et le changement de l'organisation des glycolipides dans les membranes.

#### **B - 1.1 : La synthèse bloquée**

La synthèse incomplète des glycolipides résulte du blocage d'une ou plusieurs glycosyltransférases (Hakomori, 1975) plutôt que d'une intensification de l'activité des glycosidases conduisant à l'accumulation de précurseurs structuraux ( Keenan et Morre, 1973; Siddiqui et al., 1978; Lee et al., 1982).

#### B - 1.2 : La synthèse spécifique des cellules transformées

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

Cette synthèse est le résultat de l'activité de nouvelles glycosyltransférases caractéristiques des cellules tumorales et absentes ou présentes en quantité infime, dans les cellules normales correspondantes (Pukel et al., 1982; Tableau III p.38).

#### B - 1.3 : Passage de glycolipides d'une série à une autre série

Chaque type de cellules (ou chaque lignée cellulaire) est défini par une composition caractéristique avec un pourcentage déterminé des différentes séries glycolipidiques: lacto-, globo- et ganglioséries. Le passage de la synthèse glycolipidique d'une série vers une autre série peut être observé au cours de la transformation tumorale (Hirabayashi et al., 1978).

#### B - 1.4 : Modification de l'organisation glycolipidique des membranes

L'organisation membranaire est également modifiée au cours de la transformation oncogénique. Dans de nombreuses cellules transformées, les glycolipides membranaires deviennent mieux exposés et plus accessibles aux ligands extérieurs. Les changements structuraux et

TABLEAU III

CATEGORIES	STRUCTURES	TYPES DE CANCER	REFERENCES
<u>Accumulation de précurseur</u>			
-LacCer	Gal(β1-4)Glcβ1-Cer	Gastro-intestinal	Hakomori et Murakami (1968)
-GD <sub>3</sub>	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-3)LacCer	Melanome	Nudelman et al. (1982)
-FucCer	Fuca1-Cer	Côlon	Watanabe et al. (1976)
<u>Néosynthèse</u>			
-Xglycolipide et polyXglycolipide:			
	Gal(β1-4)GlcNac(β1-3)Gal(β1-4)GlcNac(β1-3)LacCer Fuc(α1-3) / Fuc(α1-3)	Colorectal, gastrique, pulmonaire, foie	Brockhaus et al. (1982)
-Sialosyl Le <sup>a</sup> :	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNac(β1-3)Gal-R Fuc(α1-4)	Colorectal, gastrique, pancréatique	Magnani et al. (1981)

conformationnels des glycolipides peuvent donc altérer l'immunogénicité des membranes (Sjogren et al., 1972).

## B - 2 : Modifications intervenant dans les glycoprotéines

Les mêmes changements essentiels observés pour les glycolipides ont été détectés dans les glycoprotéines (Chandrasekaran et al., 1983). Toutefois, la modification majeure et commune aux chaînes glycaniques des glycoprotéines des cellules tumorales est l'apparition de glycopeptides de haut poids moléculaire (Warren et al., 1978).

### B - 2.1 : Les N-glycosylprotéines

#### - Augmentation de la taille des N-glycosylprotéines.

Des glycoprotéines membranaires de cellules tumorales ont été isolées et les glycopeptides partiellement caractérisés. Ceux-ci contiennent des résidus d'oligosaccharides à deux, trois ou quatre branches (Ogata et al., 1979). Une des altérations caractéristiques associées aux cellules transformées et tumorales est une augmentation du nombre de résidus de lactosamine : Gal(B1-4)GlcNAc- branchés sur le noyau pentasaccharidique (Tagasaki et al., 1980; Montreuil et al., 1983).

L'accroissement du nombre de branches, résulte de l'apparition d'une N-acétylglucosaminyltransférase spécifique (Glick et Santer, 1978). Dans une cellule tumorale, le rapport bi/tri antenné est inversé par rapport à la cellule normale (Delannoy et al., 1985).

#### - L'hypersialylation :

Warren et al. (1973), par l'utilisation de glycopeptides désialylés, ont mis en évidence, dans les cellules transformées, une activité sialyltransférasique capable de transférer très activement de l'acide N-acétylneuraminique à partir de CMP-NeuAc. On retrouve cette hypersialylation des glycoprotéines membranaires de tumeurs, à la fois dans les cellules transformées cultivées *in vitro* et *in vivo*.

Les glycopeptides préparés à partir des glycoprotéines de noyaux, de mitochondries, de lysosomes ou du reticulum endoplasmique des cellules transformées, présentent tous cette hypersialylation (Buck et al., 1974).

Pukel et al. (1982) ont montré l'existence d'une activité accrue de la sialylation dans les cellules de carcinomes. De même, Fukuda et al. (1985) ont mis en évidence une activité sialyltransférase liant des résidus NeuAc en ( $\alpha$ 2-8) sur des chaînes polylactosaminiques des lactosaminoglycannes isolés de cellules de carcinome embryonnaire.

- L'hyperfucosylation :

Les glycopeptides isolés de membranes de cellules tumorales présentent un taux de fucosylation supérieur à celui des glycopeptides isolés de cellules normales. Fukuda et al. (1985) ont montré l'existence de résidus N-acétylglucosaminiques substitués sur leur carbone 3 par un résidu de fucose. Ce motif disaccharidique Fuc( $\alpha$ 1-3)GlcNAc, dénommé antigène X, existe dans la structure de diverses glycoprotéines et ne représente pas une altération caractéristique de la cellule tumorale.

B - 2.2 : Les O-glycosylprotéines

On remarque généralement que les glycannes, liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique, présentent une densité plus importante et une hypersialylation. La présence sur la partie peptidique de nombreuses chaînes O-glycanniques sialylées protégerait celle-ci de l'action des protéases. Des glycoprotéines de type "mucine", de haut poids moléculaire ont été mises en évidence dans des cellules de carcinome embryonnaire par Hounsell et Feizi (1982).

L'étude structurale des glycoprotéines membranaires reste difficile car les glycannes sont très hétérogènes. Toutefois, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des structures spécifiques en facilite l'identification.

C - Les antigènes : marqueurs cellulaires

L'accumulation de précurseurs due à une synthèse bloquée ou l'apparition de "néoantigènes" permet la formation de marqueurs glycanniques, associés aux tumeurs, spécifiques d'un type cellulaire. Les marqueurs antigéniques en question, sont aussi divers que :

- l'antigène de régulation du développement des érythrocytes humains (Marsh, 1961);
- l'antigène marqueur des adénocarcinomes gastriques des sujets sécréteurs d'antigènes de groupes sanguins (Picard et al., 1978);
- le marqueur d'adénocarcinomes du côlon humain (Brown et al., 1983);
- le marqueur antigénique de l'endoderme foetal (Williams et al., 1982);
- les marqueurs distincts des granulocytes humains des cellules sanguines (Rumpold et al., 1982);
- les antigènes de la différenciation de l'épithélium du poumon (Forster et al., 1982).

Tous ces marqueurs antigéniques possèdent des structures glycaniques de glycoprotéines et de glycolipides de la surface cellulaire; ils appartiennent à la famille d'antigènes qui inclut également ceux des groupes sanguins A, B, O, Lewis et P.

#### C - 1 : Les antigènes glycaniques associés à la différenciation

Il existe un système de différenciation des antigènes glycaniques, basé sur les structures de type I ou II et sur leurs monosaccharides périphériques (Feizi, 1984).

##### C - 1.1 : Les antigènes basés sur la structure de type I

Ces structures se comportent comme des antigènes normaux de la différenciation dans "certains tissus" de "certains individus" mais sont des antigènes associés aux tumeurs pour d'autres.

Il en est ainsi de l'antigène sialyl-Le<sup>a</sup> : [NeuAc(α2-3)]Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc- fortement exprimé dans les glycolipides et les glycoprotéines des cellules cancéreuses du côlon (Warren et al., 1972; Magnani et al., 1982; Hansson et al., 1983) et de la fraction gangliosidique du méconium. Par contre, on le détecte au niveau des glycolipides pancréatiques de cellules saines (Hansson et al., 1983), des glycoprotéines du liquide séminal (Hanisch et al., 1984), des mucines salivaires solubles (Brockhaus, 1985) et des oligosaccharides du lait de sujets normaux Le(a+b-) et Le(a-b+).

C'est un antigène associé aux tumeurs dans les adénocarcinomes gastriques de sujets "sécréteurs" alors que c'est un

antigène normal appartenant à la structure glycanique des glycoprotéines des mucines gastriques de sujets "non-secréteurs".

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

#### C - 1.2 : Les antigènes basés sur la structure de type II

Les antigènes i et I sont présents dans une grande variété de types cellulaires et peuvent être portés par des protéines, des polyglycosylcéramides et des glycolipides.

Ils peuvent être dans un état antigéniquement actif ou dans un état cryptique s'ils sont périphériquement glycosylés et masqués par des monosaccharides formant les antigènes de groupes sanguins majeurs (voir IV-A).

Ainsi, il apparaît que la majorité des changements rapides et conséquents de l'antigénicité pendant l'embryogénèse et la différenciation, résulte de modifications dans la glycosylation des glycoprotéines et des glycolipides.

Les antigènes I, i et SSEA-1 ne sont pas les seuls antigènes relatifs aux groupes sanguins qui présentent des modifications durant l'embryogénèse. Les antigènes de groupes sanguins majeurs apparaissent et disparaissent également de manière ordonnée pendant le développement du foetus humain.

Comme pour les antigènes I, i, l'expression du déterminant SSEA-1 est différente pour l'Homme et la Souris. Chez la Souris adulte, le SSEA-1 est limité à certaines zones du cerveau et du tractus génito-urinaire, alors que chez l'Homme, il est largement présent dans les cellules épithéliales et dans les glycoprotéines sécrétées (Feizi, 1984). Cet antigène est un marqueur des granulocytes et est reconnu par un groupe d'anticorps monoclonaux tels le VEP 8 et le VEP 9 (Feizi, 1984).

Récemment encore, il a été isolé de l'intestin de Caille (*Coturnix Coturnix Japonica*; Nishimura et al., 1987). Il constitue la

structure glycolipidique majeure des tissus adultes de cette Caille, alors que jusqu'à ce jour, la présence de fucolipides de la série "lacto-", dans les tissus normaux, semblait limitée à quelques espèces animales. Ce n'est que douze jours après l'incubation que l'haptène X est décelé. Sa concentration augmente jusqu'au 16ème jour. A l'éclosion de l'oeuf, la composition en glycolipides est déjà semblable à celle de la Caille adulte. Ainsi la présence de cet antigène peut être un marqueur des étapes finales de l'organogénèse.

Il existe d'autres antigènes glycaniques qui se comportent comme des antigènes embryonnaires ou des antigènes associés aux tumeurs, telle la structure Y (Tableau II, p.18). Cet antigène se retrouve dans les tumeurs du côlon et comme antigène de différenciation au niveau des granulocytes humains (Brown et al., 1983).

#### C - 2 : Les antigènes : marqueurs de cellules tumorales

De nombreux déterminants de la série lacto-, associés aux tumeurs, peuvent être portés aussi bien par les glycolipides que par les glycoprotéines. Ceci est le cas pour l'haptène X et ses dérivés. Cependant, la proportion exacte d'antigènes glycolipidiques par rapport aux antigènes glycoprotéiniques n'est pas déterminée pour beaucoup de tumeurs.

Il est intéressant de constater que certains néoantigènes et notamment les déterminants fucosylés et sialylés (sialyl Le<sup>a</sup> et sialyl X) sont non seulement présents dans les tissus tumoraux mais également libérés dans le sang circulant. Ainsi le taux de ces antigènes dans le sang peut devenir un critère utile pour le diagnostic des cancers humains. Nous porterons un intérêt plus particulier à l'antigène X dont nous retrouvons fréquemment la structure dans le méconium.

##### C - 2.1 : L'antigène X dans les glycolipides

Il a été découvert dans de nombreux cas d'adénocarcinomes (Yang et Hakomori, 1971). Plus récemment, une étude systématique des glycolipides à antigène X, a été entreprise dans les tissus normaux et



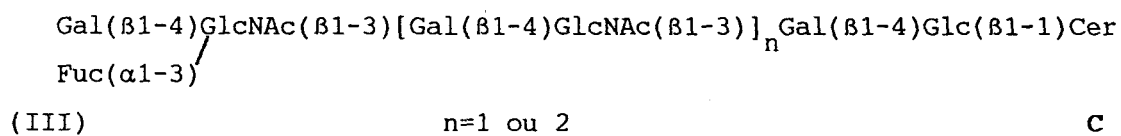
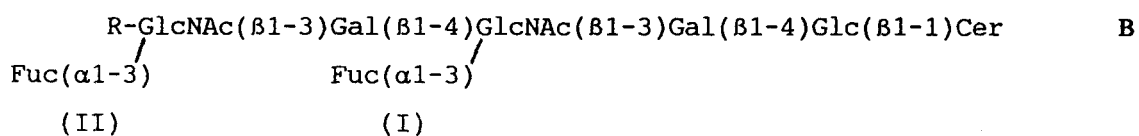
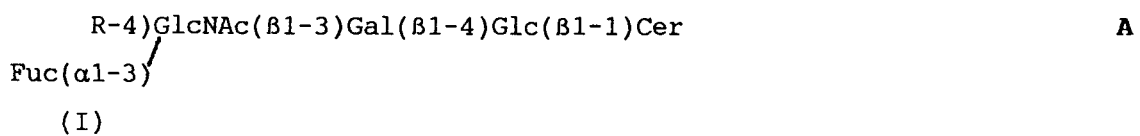
tumoraux (Magnani et al., 1984; Hirota et al., 1985a et b). La présence de glycolipides polylactosaminiques di- ou trifucosylés accumulés dans une grande variété d'adénocarcinomes humains incluant les cancers gastriques, du côlon, du foie et du poumon, est particulièrement notable. Des glycolipides présentant des structures analogues sont décrits (Fig.8, p.45 Structures A et B). D'autre part, des glycolipides avec le déterminant X à l'extrémité terminale non réductrice d'une chaîne de type II (Fig.8, Structure C), sont présents dans les tissus normaux et ne sont pas spécifiques de tumeurs. L'augmentation d'une activité fucosyltransférase peut expliquer la synthèse des résidus fucosylés I et II des formules A et B des adénocarcinomes humains puisque la disparition des marqueurs antigéniques correspond à la perte de cette même activité.

Au contraire, la fucosyltransférase responsable de la synthèse du résidu fucosylé III, ne voit pas son activité affectée par la cancérisation. C'est pourquoi, de nombreux groupes cherchent à sélectionner des anticorps monoclonaux à spécificité unique liée à la position du déterminant antigénique afin d'obtenir des marqueurs spécifiques de tumeurs ( Muramatsu et Muramatsu, 1983; Olding et al., 1984; Hirota et al., 1985a et b).

#### C - 2.2 : L'antigène X dans les glycoprotéines

Le déterminant antigénique X a été décelé dans des tissus épithéliaux variés, des tissus rénaux et gastriques (Fox et al., 1983), dans les granulocytes et finalement dans des glycoprotéines sécrétées (Feizi, 1984).

Dans les tissus normaux adultes ou les sécrétions, des chaînes glycaniques porteurs du déterminant sialyl-X ont été caractérisées chimiquement comme des composants structuraux des N-glycannes du cerveau de Rat (Krusius et Finne, 1978), des granulocytes humains (Fukuda et al., 1984) et des mucines du liquide séminal humain (Hanisch et al., 1985).



**Fig.8** : Structures des différents glycolipides polylactosaminiques fucosylés rencontrés dans les tissus humains.

Dans le liquide séminal et le liquide amniotique humain, l'antigène sialyl-X est exprimé simultanément avec le déterminant sialyl-Le<sup>a</sup>; tous deux sont également associés à certains types de tumeurs humaines.

Le sialyl-Le<sup>a</sup> a été décrit dans des cellules de tumeurs gastrointestinales et dans certaines cellules normales (Magnani et al., 1982). Cette structure est toutefois absente des cellules gastrointestinales normales.

L'antigène X est surtout présent sous sa forme sialylée. L'augmentation des résidus d'acide sialique protège la surface cellulaire de l'action protéolytique. L'acide sialique atténue l'immunogénicité par le masquage des glycanes et apparaît en corrélation avec l'aptitude à la métastase.

La présence de l'antigène X en grande quantité dans les glycoprotéines de cellules tumorales conduit à penser qu'il s'agit d'un vestige d'une différenciation avec une réexpression durant l'oncogène (Santer et al., 1983).

#### C - 2.3 : Conclusions

Les saccharides de la surface cellulaire sont des antigènes importants associés aux tumeurs. Cependant, aucun de ces antigènes caractérisés n'est spécifique d'une tumeur ou d'un type de cellules donné. Les changements observés dans les structures glycaniques sont dûs à des modifications dans la présence des nucléotides-sucres et des substrats, dans l'activité des glycosyltransférases ou dans les gènes qui codent la biosynthèse de ces enzymes.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans l'étude biologique et biochimique des glycoprotéines permettra de mieux approcher la biosynthèse et la localisation subcellulaire des glycoprotéines spécifiques telles les enzymes et les récepteurs. Ces outils seront utiles dans l'appréhension des mécanismes de glycosylation aberrante rencontrée dans les tumeurs.

#### D - Les anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux, à spécificité étroite, ont pu être produits par la technique des hybridomes (Kohler et Milstein, 1975)

fournissant un moyen rapide de détecter les antigènes qui varient durant la différenciation cellulaire et la maturation. Grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux naturels et à l'usage de plus en plus répandu des hybridomes, il apparaît clairement que de nombreux antigènes glycolipidiques et glycoprotéiniques provenant de cellules normales et néoplasiques (Feizi, 1985; Hakomori, 1985), sont bien des déterminants portés par les chaînes glycaniques plutôt que peptidiques (Tableaux IV p.48 et V p.49).

Des progrès très importants ont été réalisés grâce à la coopération des biochimistes, des immunogénéticiens et des biologistes. Ainsi, l'antigénicité (réactivité vis à vis des anticorps), l'immunogénicité (capacité à révéler les anticorps) des oligosaccharides des glycoprotéines et les possibilités actuelles d'exploitation des anticorps par des spécificités glycaniques définies fournissent des preuves de structure et de distribution cellulaire des glycoprotéines (Feizi et Childs, 1987).

#### **D - 1 : Les oligosaccharides des glycoprotéines : antigènes majeurs des cellules entières**

Des études utilisant les anticorps monoclonaux ont montré que de nombreux antigènes glycaniques qui se transforment au cours des étapes successives de la différenciation, sont portés par des chaînes poly-N-acétyllactosaminiques de glycoprotéines polydispersées de haute masse moléculaire (Childs et al., 1983). Parmi ces antigènes, ceux déjà décrits : i,I et SSEA-1.

Il existe de nombreuses analogies entre les cellules carcino-embryonnaires, d'une part, (Martin, 1980) et les promyélocytes HL60, d'autre part, (Magnani, 1984). Une grande proportion d'anticorps monoclonaux des promyélocytes HL60 de la leucémie reconnaît un antigène apparenté à SSEA-1 (Feizi, 1984; Magnani, 1984). Cet antigène détecté à la fois par immunoblotting de cellules entières lysées et immunoprécipitation des glycoprotéines de surface marquées (Feizi, 1983; Urdal et al., 1983; Tetteroo et al., 1984) est porté principalement par des glycoprotéines de surface, de haut poids moléculaire (supérieur à 100.000) et migrant par diffusion.

TABLEAU IV

ANTIGENES DE DIFFERENCIATION, DETECTES PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX ET LES STRUCTURES GLUCIDIQUES DE TYPE 1 OU DE TYPE 2 QUI LEUR CORRESPONDENT (d'après FEIZI, 1985).

	Structure	Designation of antigen	Cell association
1	Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 3(Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 3) <sub>2</sub>	i	Fetal erythrocytes, human <sup>17,18</sup> ; primary endoderm, mouse <sup>23</sup>
2	Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 3Galβ1 → 4GlcNAcβ1	I	Adult erythrocytes, human <sup>19</sup> ; preimplantation embryos, mouse <sup>23,24</sup>
3	Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 3Gal/GalNAc	I(Ma)	Adult erythrocytes, human <sup>21</sup> ; gastric mucosa, non-secretors; gastric adenocarcinomas, secretors <sup>37,38,40</sup>
4	Galβ1 → 4GlcNAc ↑ <sub>1,3</sub> Fuca	M18, M39 SSEA-1 VEP8 and VEP9, Myl, VIM-D5 etc. D <sub>1</sub> ,56-22 (X hapten, Le <sup>a</sup> )	Breast epithelium, human <sup>82</sup> 8-Cell stage mouse embryo <sup>25,26,33</sup> Myeloid cells, human <sup>29,35,83</sup> Colorectal cancer, human <sup>34</sup>
5	Galβ1 → 4GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> Fuca	TRA-T-85 (blood group H)	Human cell lines*
6	Galβ1 → 4GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> ↑ <sub>1,3</sub> Fuca    Fuca	C14 F3 AH6 (Y hapten, Le <sup>y</sup> )	Colonic adenocarcinoma, human <sup>84</sup> Lung adenocarcinoma, human <sup>85</sup> Gastric cancer, human <sup>86</sup> Embryonal carcinoma cells, human and mouse <sup>87</sup>
7	GalNAcα1 → 3Galβ1 → 4/3GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> Fuca	TL5 (blood group A)	EGF receptor of A431 cells <sup>55</sup>
8	Galα1 → 3Galβ1 → 4GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> Fuca	E <sub>1</sub> series (blood group B)	Pancreatic cancer <sup>34</sup>
9	Galβ1 → 3GlcNAcβ1 → 3Galβ1 → 4Glc/GlcNAc	FC10.2	Embryonal carcinoma cells, human <sup>88</sup> ; gastric mucosa, non-secretors; gastric adenocarcinoma, secretors <sup>40</sup>
10	Galβ1 → 3GlcNAc ↑ <sub>1,4</sub> Fuca	CO-514 (blood group Le <sup>a</sup> )	Adenocarcinomas, human <sup>89</sup>
11	Galβ1 → 3GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> ↑ <sub>1,4</sub> Fuca    Fuca	NS-10 CO-43 (blood group Le <sup>b</sup> )	Adenocarcinomas, human <sup>89</sup>
12	GalNAcα1 → 3Galβ1 → 3/4GlcNAc ↑ <sub>1,2</sub> ↑ <sub>1,3/4</sub> Fuca    Fuca	G49 MH2 (blood group ALe <sup>b</sup> /Le <sup>y</sup> )	EGF receptor of A431 cells <sup>90</sup> Colonic adenocarcinoma, human (cited in ref. 53)
13	Galβ1 → 3GlcNAc ↑ <sub>2,3</sub> ↑ <sub>1,4</sub> NeuAcα    Fuca	19.9 (sialyl Le <sup>a</sup> )	Colon cancer, human <sup>39</sup> ; normal pancreatic ducts <sup>34</sup> , normal gastric mucins, non-secretors; gastric cancer mucins, secretors <sup>40</sup> ; human seminal fluid proteins <sup>41</sup>

TABLEAU V

ANTIGENES DE DIFFERENCIATION DETECTES PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX OU DES "AUTOANTICORPS" ET LES STRUCTURES GLUCIDIQUES DES GLYCOLIPIDES DES SERIES LACTO-, GANGLIO- OU GLOBOSIDES QUI LEUR CORRESPONDENT.  
(d'après FEIZI, 1985).

	Structure	Designation	Cell association
Lactosyl series			
14	Galβ1 → 4Glc-Cer	T <sub>5</sub> A <sub>7</sub> (lactosylceramide)	Myeloid cells, human <sup>91</sup>
15	Galβ1 → 4Glc-Cer ↑ 2,3 NeuAca ↑ 2,8 NeuAca	R <sub>24</sub> 4.2 (G <sub>D3</sub> )	Melanoma, human <sup>92,93</sup>
16	Galβ1 → 4Glc-Cer ↑ 2,3 NeuAca ↑ 2,8 Neu5,9Ac <sub>2</sub> α	D1.1	Neuroectoderm, rat; melanoma, human <sup>94</sup>
Ganglio series			
17	GalNAcβ1 → 4Galβ1 → 4Glc-Cer ↑ 2,3 NeuAca	OFA-1 (autoantigen) (G <sub>M2</sub> )	Melanoma and fetal brain, human <sup>95</sup>
18	GalNAcβ1 → 4Galβ1 → 4Glc-Cer ↑ 2,3 NeuAca ↑ 2,8 NeuAca	OFA-2 (autoantigen) (G <sub>D2</sub> )	Melanoma, human <sup>96</sup> Neuroectoderm, human <sup>97</sup>
Globo series			
19	Gala1 → 4Galβ1 → 4Glc-Cer	38.13 (blood group P <sup>k</sup> )	Burkitt lymphoma cell lines <sup>98</sup>
20	GalNAca1 → 3GalNAcβ1 → 3Gala1 → 4Galβ1 → 4Glc-Cer	M1:22:25:8 (Forssman)	Embryos and embryonal carcinoma cells, mouse <sup>3,4</sup>
21	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">SSEA-4</div> <div style="border-top: 1px solid black; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">             NeuAca2 → 3Galβ1 → 3GalNAcβ1 → 3Gala1 → 4Galβ1 → 4Glc-Cer           </div> <div style="margin-left: 10px;">SSEA-3</div> </div>	SSEA-3, SSEA-4	4- To 8-cell-stage embryos, mouse <sup>99,100</sup>



Le déterminant i associé aux structures linéaires poly-N-acétyllactosaminiques (iDen) est également porté par ces glycoprotéines. Feizi et Childs (1987), par l'emploi d'anticorps monoclonaux, constatent un manque de réactivité de l'anti-I Step qui reconnaît les structures longues et branchées des structures poly-N-acétyllactosaminiques et, par contre, une forte réactivité de l'anti-I Ma qui reconnaît la courte séquence branchée N-acétyllactosaminique vis à vis des cellules embryonnaires de Souris (Fig.9, p.50).

Deux familles majeures de glycoprotéines sont également différenciées en fonction de leur immunoréactivité à la surface des cellules HL60 : la première ayant un corps linéaire poly-N-acétyllactosaminique et correspondant en structure aux oligosaccharides N-glycosylés (Sponcer et al., 1984; Mizoguchi et al., 1984), et la deuxième, un corps court et branché correspondant à la structure O-glycannique de la sialoglycoprotéine majeure appelée leucosialine (Carlsson et al., 1986).

#### D - 2 : Les oligosaccharides, antigènes majeurs de glycoprotéines

L'immunochimie a joué un rôle important dans l'étude biologique et biochimique des glycoprotéines hormonales et enzymatiques ainsi que des récepteurs. Aujourd'hui, on peut donner des exemples de glycoprotéines où les structures glycanniques sont des composants immunogéniques importants. Il en est ainsi pour le récepteur du facteur de croissance EGF "epidermal growth factor" et la galactosyltransférase du lait humain.

L'emploi des anticorps monoclonaux dans des expériences d'immunoblotting (Childs et al., 1986) a permis de caractériser les antigènes glycanniques du facteur de croissance EGF (Fig.10, p.52) et des enzymes glycoprotéiniques, telle la galactosyltransférase purifiée sous forme soluble à partir du lait humain (Fig.11, p.53).

D'autres exemples, d'une approche à la fois immunologique et biochimique de l'étude des oligosaccharides issus de glycoprotéines concernent la découverte :

- de la séquence pentasaccharidique :



Anticorps	Structures reconnues	Désignation de l'antigène
M39	Gal(β1-4)GlcNAc	
3C1B12	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3/6) Fuc(α1-3) / Gal	X ou SSEA-1 branché
C14	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2) / Fuc(α1-3)	apparenté à Le <sup>b</sup>
TL5	GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2)	Groupe sanguin A
G49	GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2) / Fuc(α1-4/3)	Groupe sanguin ALe <sup>b/y</sup>
CF4	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-4)	apparenté à Le <sup>a</sup>

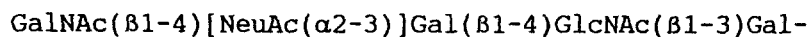
**Fig.10** : Séquences glucidiques du squelette et de la région périphérique, des oligosaccharides du facteur de croissance (EGF), déduites d'expériences d'immunoblotting, à l'aide de six anticorps monoclonaux (d'après Feizi et Childs, 1987).

Anticorps	Structures reconnues	Désignation de l'antigène
anti-SSEA-1	Gal(β1-4)GlcNAc Fuc(α1-3)	antigène X ou SSEA-1
CF4	Gal(β1-3)GlcNAc Fuc(α1-4)	Le <sup>a</sup>
G49	GalNAc(α1-3)Gal(β1-3/4)GlcNAc Fuc(α1-2)Fuc(α1-4/3)	Groupe sanguin ALe <sup>b/y</sup>

Source de galactosyltransférase

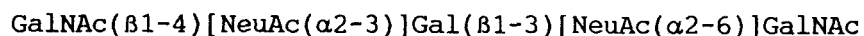
Anticorps	Source de galactosyltransférase	
	groupe sanguin A sécréteur	groupe sanguin O non-sécréteur
anti-SSEA-1	+	+
CF4	+	+
G49	+	-

**Fig.11** : Séquences glucidiques de la galactosyltransférase du lait humain, purifiée d'un individu de groupe sanguin A, sécréteur et d'un individu de groupe sanguin O, non sécréteur. Ces séquences sont déduites par immunoblotting de glycoprotéines purifiées, à l'aide d'anticorps monoclonaux (d'après Feizi et Childs, 1987).



du déterminant de groupe sanguin Sd<sup>a</sup>, sur les N-glycannes de la glycoprotéine de Tamm-Horsfall (Donald et al., 1984);

- de la structure pentasaccharidique suivante :



isolée des chaînes O-glycanniques de la glycophorine A provenant d'érythrocytes portant l'antigène Cad (Blanchard et al., 1983).

La figure 12 (p.55), empruntée des travaux de Feizi et Childs (1987) résume les moyens d'approche immunochimique, des séquences oligosaccharidiques d'une N-glycosylprotéine de type poly-N-acétyllactosaminique.

## VI - BASES GENETIQUES DE LA GLYCOSYLATION

### A - Relation gène-enzyme.

La biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques implique la participation de nombreuses glycosyltransférases, généralement une par monosaccharide transféré (Hagopian et Eylar, 1968). Chaque enzyme est codée par plusieurs gènes qui peuvent être localisés à différents endroits du génôme. Toutefois, les antigènes oligosaccharidiques ont un contrôle génétique, plus complexe que les antigènes polypeptidiques. Et le concept classique suivant lequel "one gene one antigen" ne peut s'appliquer aux déterminants glycanniques puisque leur synthèse requiert la participation de nombreuses enzymes et par conséquent de nombreux gènes. Ce processus de biosynthèse à étapes multiples donne des propriétés particulières à ces systèmes antigéniques.

Deux ou plusieurs enzymes, chacune provenant d'un gène différent, participent à la synthèse d'un épitope oligosaccharidique. Cette structure oligosaccharidique, produite par plus d'une enzyme, peut être spécifiquement reconnue par un anticorps unique. Cet anticorps est différent des anticorps réagissant avec les séquences oligosaccharidiques

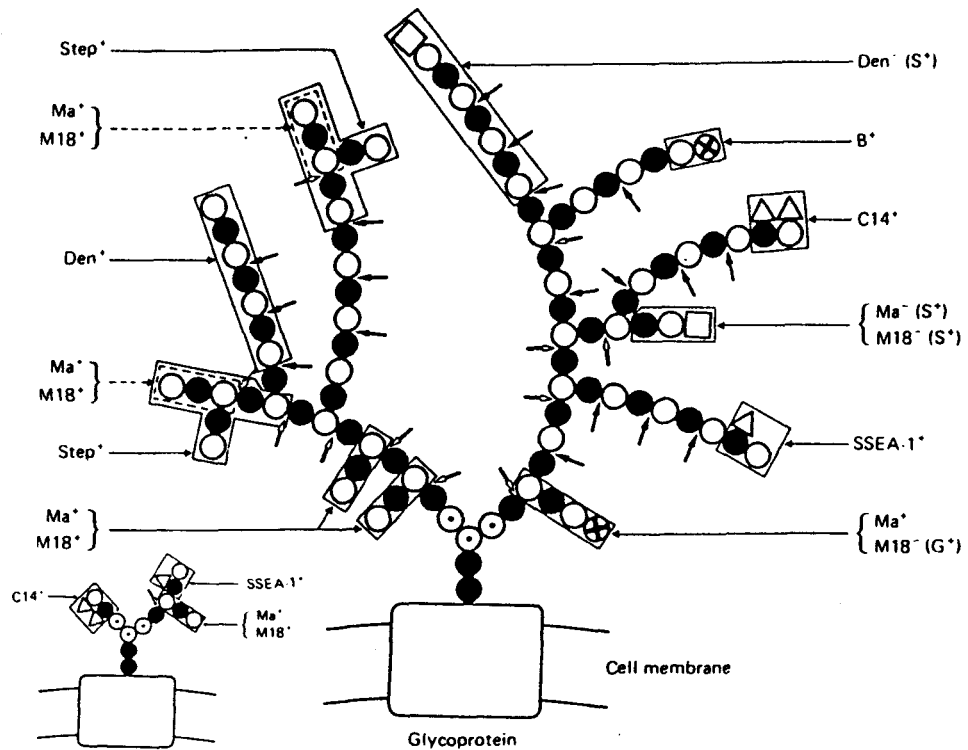


Fig.12: Schéma d'une glycoprotéine N-glycosylée, provenant de cellules embryonnaires, de type poly-N-acétyllactosaminique, présentant des réactivités vis à vis d'anticorps monoclonaux et sensibles à l'action de l'endo- $\beta$ -galactosidase.

Légendes:

La branche gauche de cette glycoprotéine hypothétique représente un squelette poly-N-acétyllactosaminique non substitué où les branches courtes réagissent avec les anticorps anti-I Ma et M18 (Ma<sup>+</sup>, M18<sup>+</sup>), où les longues séquences branchées réagissent avec les anticorps anti-I Step (Step<sup>+</sup>) et les séquences non branchées avec les anticorps anti-I Den (Den<sup>+</sup>).

Sur la branche droite, les déterminants sont masqués (Den<sup>-</sup>, Ma<sup>-</sup>, M18<sup>-</sup>) par des résidus acides sialiques mais sont révélés après action de la sialidase (S<sup>+</sup>) ou masqués par des résidus  $\alpha$ Gal, révélés après action de l' $\alpha$ -galactosidase (G<sup>+</sup>).

➡ : liaisons internes  $\beta$ -galactosyl, résistantes à l'action de l'endo- $\beta$ -galactosidase au niveau des points de branchements.

➔ : liaisons internes  $\beta$ -galactosyl du squelette linéaire poly-N-acétyllactosaminique, sensibles à l'action de l'endo- $\beta$ -galactosidase (d'après Feizi et Childs, 1987).

Symboles:

- GlcNAc; ⊙  $\alpha$ Man ou  $\beta$ Man; ○  $\beta$ Gal; ⊗  $\alpha$ Gal;  $\Delta$   $\alpha$ Fuc; □  $\alpha$ NeuAc.

partielles ou incomplètes qui sont produites si l'une ou l'autre des glycosyltransférases n'est pas active.

Chaque enzyme utilise un accepteur spécifique. Cependant, dans certains cas, il y a "redondance" quand plus d'une enzyme catalyse le transfert du même monosaccharide sur le même accepteur (cas des enzymes X et Le).

Dans d'autre cas, il y a "dégénérescence" de la spécificité enzymatique quand une seule enzyme utilise deux récepteurs différents et produit deux épitopes différents (Oriol et al., 1986).

### **B: Philogénie des antigènes ABH**

Les structures glycaniques du système ABO sont considérées comme les principaux antigènes des cellules érythrocytaires. Ce concept est valable pour l'homme. Cependant, des études sur des cellules animales ont montré que les antigènes ABH étaient d'abord apparus comme des antigènes tissulaires. On les trouve dans les cellules épithéliales de l'endoderme et de l'ectoderme des mammifères inférieurs dont les cellules rouges sont dépourvues de déterminants ABH. En fait, les érythrocytes sont les cellules les plus récentes dans l'arbre de l'évolution (Fig.13, p.57)

Chacun des quatre précurseurs de chaînes oligosaccharidiques (décrits précédemment) porteurs des antigènes ABH, peut acquérir la structure antigénique H par addition d'un résidu fucose en ( $\alpha$ 1-2) du galactose terminal. Cette fucosylation s'effectue sous l'effet d'enzymes spécifiques, les  $\alpha$ -2-fucosyltransférases.

### **C - Les enzymes, sous contrôle des gènes H et Se**

Des études biochimiques effectuées dans différents laboratoires ( Kumazaki et Yoshida, 1984; Le Pendu et al., 1985; Betteridge et Watkins, 1985) ont mis en évidence au moins deux différentes  $\alpha$ -2-fucosyltransférases, l'une utilisant de préférence le précurseur de type 1 : Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc-R, et l'autre, le précurseur de type 2 : Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R. Ces deux enzymes sont présentes dans les mucines gastriques et les glandes salivaires (Betteridge et Watkins, 1986), mais






ABH	Muqueuses digestives	Epiderme	Récepteurs olfactifs	Ganglions lymphatiques	Endothélium vasculaire	Cellules rouges
	+	+	+	-	-	-
	+	-	-	+	-	-
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+

Fig.13 : Présence des antigènes ABH dans les différents tissus du Rat, du Lapin, du Ouistiti, du Babouin et de l'Homme (d'après Oriol et al., 1986)

seule l' $\alpha$ -2-fucosyltransférase du précurseur 2 se retrouve dans les cellules rouges. En conséquence, les principaux épitopes H synthétisés par les cellules rouges sont de type 2 (Watkins, 1980). L'enzyme correspondante est codée par le gène H localisé sur le chromosome 19 (Westerveld et Naylor, 1984).

Oriol et al. (1981) ont proposé un modèle génétique dans lequel 2 gènes structuraux fortement associés, H et Se, coderaient chacun pour une  $\alpha$ -2-fucosyltransférase différente.

Dans le modèle, les deux loci sont fortement liés sur le chromosome 19. Le gène H code pour l' $\alpha$ -2-fucosyltransférase exprimée dans les cellules rouges et le gène Se code l' $\alpha$ -2-fucosyltransférase exprimée dans les glandes salivaires.

En règle générale, les cellules exprimant l'enzyme produite par le gène Se possèdent des antigènes H du type 1 et 2 tandis que les cellules contenant l'enzyme produite par le gène H expriment des antigènes H de type 2 uniquement.

#### D: Les antigènes Lewis

Deux loci Se et Le contribuent à la synthèse des antigènes Lewis. Le gène Le a été localisé sur le chromosome 19 (Westerveld et Naylor, 1984). La fucosyltransférase codée par le gène Se ajoute un résidu fucose au galactose terminal tandis que l'enzyme codée par le gène Le ajoute un résidu fucose à la N-acétylglucosamine subterminale. En conséquence, la présence ou l'absence de l'un ou l'autre de ces résidus fucosylés détermine les structures illustrées dans le Tableau II.

#### E: Les antigènes X et Y

Ces antigènes sont des isomères de type 2 de Le<sup>a</sup> et Le<sup>b</sup>. On les nomme aussi Le<sup>x</sup> et Le<sup>y</sup> (Kannagi et al., 1982).

L'antigène X résulte du transfert d'un résidu fucose en ( $\alpha$ 1-3) du résidu GlcNAc provenant du précurseur de type 2 (I ou i) et

l'antigène Y, du transfert de deux résidus fucose en ( $\alpha$ 1-2) et ( $\alpha$ 1-3) sur le même précurseur.

Les mêmes déterminants antigéniques X et Y surviennent dans les oligosaccharides indépendamment des gènes Le et Se, ce qui implique que la synthèse de l'antigène X soit aussi catalysée par une autre enzyme, la X-fucosyltransférase.

Toutefois, il doit exister au moins 2  $\alpha$ -3-fucosyltransférases, l'une codée par un gène X et l'autre par un gène Le. Bien que l'on n'ait peu de connaissances sur le gène X, ces deux enzymes ont été trouvées et malgré leur capacité à utiliser le même précurseur 2, elles sont nettement différentes (Johnson et al., 1981) :

- l'enzyme X possède une spécificité étroite vis à vis de son substrat tandis que l'enzyme Le peut utiliser tout à la fois les deux types de précurseurs;

- On trouve l'enzyme X dans le sérum alors que l'enzyme Le n'y est pas décelée.

Tous les loci connus pour les fucosyltransférases (H, Se, Le) sont situés sur le chromosome 19, il est donc possible que le gène X puisse aussi se situer sur ce chromosome, fermement associé au gène Le, de la même manière que le gène H est fermement associé au gène Se (Oriol et al., 1986).

## VII - LES ANTIGENES Cad ET Sd<sup>a</sup>

### A - L'antigène Cad

L'antigène de groupe sanguin Cad est un antigène rare : sa fréquence est de l'ordre de 0,07% en France (Gerbil et al., 1976a) et de 0,03% au Japon (Race et Sanger, 1975c) pour atteindre une fréquence beaucoup plus importante en Thaïlande, de l'ordre de 0,26% (Sringarm et al., 1972 et 1974).

Il a été décrit pour la première fois par Casal et al (1968) dans une famille française de l'île Maurice. Depuis lors, l'analyse de plusieurs autres familles a confirmé ces résultats sérologiques



associant l'agglutination d'érythrocytes, apparemment O ou B, par la lectine de Dolichos biflorus et une polyagglutinabilité, plus ou moins facilement mise en évidence par les sérums humains ABO compatibles (Cazal et al., 1971a; Sringarm et al., 1972; Lewis et al., 1973; Sringarm et al., 1974; Lopez et al., 1975; Bird et Wingham, 1976; Gerbal et al., 1976a, 1976b).

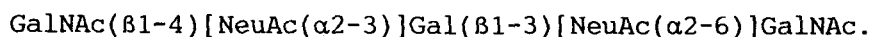
L'étude des familles indique que l'antigène Cad est transmis de façon héréditaire selon le type mendélien dominant, indépendamment des antigènes de groupes sanguins ABO, Rhésus, Lewis.... et des marqueurs génétiques des protéines.

Dans la famille initialement décrite par Cazal et al. (1968), la totalité des érythrocytes des individus Cad<sup>+</sup> est agglutinable par la lectine de Dolichos biflorus alors qu'une image de double population est observée dans les autres familles. Le pourcentage de cellules agglutinées varie considérablement d'une famille à l'autre, de 5 à 70% dans l'échantillon de 50 individus Cad<sup>+</sup> étudiés par Lopez et al. (1975) et à l'intérieur même d'une famille.

Cette hétérogénéité a permis à Cazal et al. (1971a et b) de suggérer le classement des échantillons Cad en 3 catégories dites Cad 1, Cad 2 et Cad 3, définies en fonction de leur affinité vis à vis de la lectine de Dolichos biflorus. Cette classification repose vraisemblablement sur des différences de densité antigénique d'un échantillon à un autre et suggère que le nombre de récepteurs érythrocytaires pour la lectine, décroît dans l'ordre suivant: Cad 1 > Cad 2 > Cad 3.

L'agglutination des érythrocytes Cad par la lectine de Dolichos biflorus est inhibée par la N-acétylgalactosamine, ce qui révèle la nature glucidique du déterminant antigénique (Cazal et al., 1971a; Sanger et al., 1971). Par ailleurs, certaines lectines reconnaissant la GalNAc telles Helix aspersa et Salvia horminum, présentent une affinité pour les érythrocytes Cad alors que d'autres telles Salvia sclarea et Phaseolus lunatus, n'en présentent pas (Bird et Wingham, 1971; Uhlenbruck et al., 1971; Moore et Marsh, 1975). La structure antigénique Cad a finalement été localisée sur les chaînes O-glycanniques des

sialoglycoprotéines membranaires des glycophorines A et B, et élucidée (Blanchard et al., 1983, Herkt et al., 1985):



## B - Le système Sid

### B - 1 : Diverses sources d'antigène Sd<sup>a</sup>

Il a été découvert indépendamment par deux groupes de chercheurs en 1967, Mc Vie et al., Renton et al. et est défini comme un anticorps humain dénommé anti-Sd<sup>a</sup> identifié dans le sérum d'un donneur, à la suite d'un accident transfusionnel. Les érythrocytes de 92% de la population caucasienne portent l'antigène Sd<sup>a</sup>. Cependant, seule une faible proportion des érythrocytes circulants est agglutinée par les anticorps anti-Sd<sup>a</sup>.

Chez l'homme, l'antigène Sd<sup>a</sup> est présent dans la plupart des sécrétions : dans l'urine, en particulier, une forte activité antigénique est mise en évidence par inhibition de l'agglutination des érythrocytes Sd(a+) par l'anti-Sd<sup>a</sup> (Morton et al., 1970). Environ 50% des individus de phénotype érythrocytaire Sd(a+) possèdent une activité Sd<sup>a</sup> urinaire et sont considérés comme Sd(a+) puisqu'ils ne produisent pas d'anticorps anti-Sd<sup>a</sup>. La proportion des sujets Sd(a+) vrais s'élève ainsi à 96%.

L'antigène Sd<sup>a</sup> est également présent dans le plasma, le liquide gastrique et la salive où il est sécrété indépendamment du caractère sécréteur de l'individu. Il n'est cependant pas exprimé sur les érythrocytes des nouveaux-nés bien qu'ils possèdent une forte activité Sd<sup>a</sup> dans la salive et surtout dans le méconium (Morton et al., 1970).

Les érythrocytes ne deviennent agglutinables par les anti-Sd<sup>a</sup> que 10 semaines environ après la naissance (Mac Vie et al., 1967; Renton et al., 1967).

Les anti-Sd<sup>a</sup> sont des anticorps naturels de classe IgM, présents chez environ 1% des donneurs dont les érythrocytes et l'urine ne

possèdent pas l'antigène Sd<sup>a</sup> (Mc Vie et al., 1967; Renton et al., 1967; Morton et al., 1970). Ces anticorps agglutinent les érythrocytes Sd(a+). La réactivité antigénique Sd<sup>a</sup> varie considérablement d'un échantillon de sang Sd(a+) à un autre.

Sanger et al., (1971) ont observé les premiers que les érythrocytes Cad+ sont très fortement agglutinés par les anti-Sd<sup>a</sup>. Cette observation leur a permis de proposer la dénomination Sd(a++) ou "Super Sid" pour les érythrocytes à réactivité Cad.

On trouve également ce déterminant antigénique dans les tissus et sécrétions de nombreuses espèces animales.

#### B - 2 : La glycoprotéine de Tamm-Horsfall et les mucines urinaires

Nous venons de voir que divers tissus, en particulier le rein, possèdent une activité Sd<sup>a</sup> (Morton et al., 1970; Pickles et Morton, 1977; Race et Sanger, 1975c). Dans l'urine, le déterminant Sd<sup>a</sup> est porté par la glycoprotéine de Tamm-Horsfall (Tamm et Horsfall, 1950; Morgan et al., 1979; Soh et al., 1980) et par des mucines (Cartron et al., 1982).

Enfin il faut signaler que les mucines intestinales du nouveau-né, possèdent également une forte activité Sd<sup>a</sup> (Morton et al., 1970).

##### B - 2.1 : La glycoprotéine de Tamm-Horsfall (T-HG).

La T-HG est sécrétée par les cellules des tubules rénales. Le rein semble être l'unique source de cette glycoprotéine présente dans l'urine à un taux de 25 à 50 mg par 24 h. C'est une macromolécule de masse molaire 80.000, contenant 30% de glycannes (Fletcher, 1972). Les chaînes oligosaccharidiques sont uniquement N-glycosylées (Afonso et al., 1981; Serafini-Cessi et Dall'Olio, 1982, Williams et al., 1984).

##### B - 2.2 : Les mucines urinaires.

Les mucines urinaires purifiées présentent une masse molaire apparente de 340.000 et un haut contenu en N-acétylgalactosamine. L'analyse de leur composition en aminoacides et en monosaccharides est tout à fait différente de celle de la glycoprotéine T-H (Cartron et al., 1982).

Les glycoprotéines de Tamm-Horsfall de sujets Sd(a+) et Sd(a-) diffèrent seulement par leur contenu en GalNAc; les échantillons Sd(a+) en contiennent 1 à 2% et les Sd(a-) moins de 0,2% démontrant que ce monosaccharide fait partie du déterminant Sd<sup>a</sup> (Soh et al., 1980). Ce fait, renforce les observations de Sanger et al. (1971), Bird et Wingham (1971) montrant que la N-acétylgalactosamine inhibe l'agglutination des cellules Sd(a+) avec la lectine de Dolichos biflorus.

### B - 3 : Différentes structures intervenant dans l'antigénicité Sd<sup>a</sup>

- Le disaccharide GalNAc(β1-4)Gal isolé de la glycoprotéine de Tamm-Horsfall (Donald et al., 1982), représente 75% de la structure de cette glycoprotéine. Mais bien que ce disaccharide inhibe la lectine de Dolichos biflorus, il ne réagit pas avec les anti-Sd<sup>a</sup> humains et ne peut être le déterminant complet Sd<sup>a</sup>.

- Finalement, le déterminant Sd<sup>a</sup> a été identifié comme étant un pentasaccharide (Donald et al., 1983) de structure:

GalNAc(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal-  
après action de l'endo-β-galactosidase sur une glycoprotéine T-H(Sd<sup>a</sup>).

Parmi les produits de la digestion enzymatique, les précurseurs supposés du pentasaccharide : Gal(1-4)GlcNAc(β1-3)Gal et NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal ont été identifiés.

Donald et Feeney (1986) après action d'une exo-glycosidase, récupèrent les mêmes composés et en font l'analyse en RMN du proton à 500 MHz.

D'autres travaux menés sur les membranes de cellules rouges, fortement Sd(a+), soumises à l'action de l'endo-β-galactosidase indiquent une fraction présentant une mobilité chromatographique similaire

au pentasaccharide actif (Yates et al., non publié). L'étude en RMN du proton à 500 MHz, de la fraction réduite, révèle la présence d'au moins 2 composés et un ensemble de signaux concordant avec la structure du pentasaccharide décrit ci-dessus. Bien que les structures n'aient pas été entièrement élucidées, elles montrent qu'une partie au moins des déterminants est du même type que ceux trouvés sur la glycoprotéine de Tamm-Horsfall avec le trisaccharide terminal lié à la N-acétylglucosamine.

L'activité Sd<sup>a</sup> se retrouve dans l'urine de nombreux mammifères en particulier dans celle du Cobaye. Serafini-Cessi et Dall'Olio (1983) ont montré que les microsomes rénaux provenant de Cobayes contiennent une N-acétylgalactosaminyltransférase capable de transférer la N-acétylgalactosamine de l'UDP-GalNAC à des structures possédant l'unité disaccharidique terminale : NeuAc(α2-3)Galβ-. La biosynthèse de précurseurs à partir de cette enzyme s'est avérée très utile dans les tests d'inhibition permettant l'établissement des principales structures réagissant avec le sérum humain anti-Sd<sup>a</sup> (Donald et al., 1987).

Les trisaccharides sialylés : NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)Glc et NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAC ont servi de substrats accepteurs. Les deux tétrasaccharides obtenus, identifiés par méthylation et RMN du proton à 500 MHz, indiquent que la N-acétylgalactosamine a bien été transférée sur le galactose par une liaison (β1-4), caractérisant l'enzyme comme une (β1-4)-N-acétylgalactosaminyltransférase (Soh et al., non publié).

A l'aide de ces structures tétrasaccharidiques, d'analogues divers et du pentasaccharide actif Sd<sup>a</sup> dans des expériences d'inhibition de l'hémagglutination, il a pu être démontré (Donald et al., 1987) que la N-acétylgalactosamine et l'acide N-acétylneuraminique étaient tous deux essentiels à l'activité Sd<sup>a</sup> (Tableau VI, p.65).

Le pentasaccharide responsable de l'activité Cad :  
GalNAC(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GalNAC  
isolé par Blanchard et al. (1983) et décrit par Herkt et al. (1985) réagit aussi avec le sérum humain anti-Sd<sup>a</sup>.

L'activité biologique des deux pentasaccharides (Donald et al., 1983; Herkt et al., 1985) n'a pas été comparée dans un même test.

TABLEAU VI

STRUCTURES ET ACTIVITES SEROLOGIQUES DES OLIGOSACCHARIDES Sd(a+) ET DES COMPOSES QUI LEUR SONT APPARENTES.

Composé	Structure	Quantité minimum (µg/10µl) donnant une inhibition com- plète de l'agglutination*
I	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal NeuAc(α2-3)	1.5
II	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal NeuAc(α2-3)	>200
III	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal	>200
IV	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal-ol NeuAc(α2-3)	1.5
V	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)Glc-céramide NeuAc(α2-3)	>200
VI	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)Glc NeuAc(α2-3)	50
VII	GalNAc(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc NeuAc(α2-3)	3

\*Hémagglutination des cellules Sd(a++) par le sérum humain anti-Sd<sup>a</sup>

(d'après Donald et al., 1987).

Cependant les résultats obtenus par ces deux équipes, indiquant une activité inhibitrice vis à vis des sérums anti-Sd<sup>a</sup> tout à fait comparable, suggèrent que les structures internes Gal(β1-4)GlcNAc ou Gal(β1-3)GalNAc des oligosaccharides, ne modifient pas de manière significative l'activité du déterminant Sd<sup>a</sup>.

L'unité trisaccharidique commune à ces deux antigènes aurait pu être seule responsable de l'activité Sd<sup>a</sup>. Mais le ganglioside GM<sub>2</sub> (composé V du Tableau VI, p.65) qui contient cette unité terminale n'est pas actif (Donald et al., 1987).

Depuis, il est apparu que pour obtenir une activité Sd<sup>a</sup> maximale, il est essentiel qu'un résidu N-acétylhexosamine soit lié à l'unité trisaccharidique terminale. Le Tableau VI donne les structures et les activités sérologiques des oligosaccharides Sd(a+) et des composés qui leur sont affiliés.

**TRAVAUX PERSONNELS**



## INTRODUCTION

Les travaux antérieurement effectués par Blanchard et al. (1983) et Herkt et al. (1983) ont porté sur l'identification de l'antigène de groupe sanguin Cad au niveau des érythrocytes. Six glycanes détachés par  $\beta$ -élimination de la glycophorine A d'érythrocytes humains de sujets Cad ont ainsi été isolés et identifiés par HPLC sur alkylamine et RMN du proton à 500-MHz. Les études structurales de ces oligosaccharides ont permis de démontrer que l'activité Cad était portée par une structure oligosaccharidique possédant un résidu GalNAc en position terminale non réductrice, conjugué au reste de la séquence par une liaison ( $\beta$ 1-4).

C'est cette étude que nous avons poursuivie en essayant de mettre en évidence la présence de l'antigène de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> dans les érythrocytes humains et dans les mucines urinaires compte tenu de la relation structurale qui existe entre les déterminants Cad et Sd<sup>a</sup>. Dans un deuxième temps nous avons étendu nos recherches à un autre milieu biologique: le méconium qui présente une forte réactivité vis à vis de l'antigène Sd<sup>a</sup>. Ce matériel biologique présente en outre l'avantage d'être disponible en plus grande quantité que les mucines urinaires.

Ce travail est réalisé en collaboration avec le Centre National de Transfusion sanguine de Paris (Dr. J-P Cartron).

## I - LA GLYCOPHORINE A

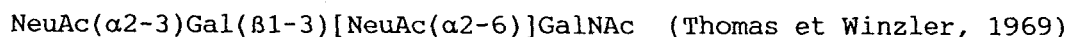
### A: Nomenclature

Les glycoprotéines des membranes érythrocytaires ont été largement étudiées dans de nombreux laboratoires. Une nomenclature de ces glycoprotéines a été proposée par Anstee et al. (1979), d'après leur mobilité électrophorétique observée par Laemmli (1970). Elle repose sur l'identification de quatre composés monomères majeurs : la glycoprotéine  $\alpha$  (monomère de la glycophorine A), la glycoprotéine  $\beta$  (monomère de la glycophorine C), la glycoprotéine  $\tau$  et la glycoprotéine  $\delta$  (monomère de la glycophorine D).

Les glycophorines A et B sont en relation étroite avec les antigènes de groupes sanguins MN et Ss respectivement (Gahmberg et al., 1981; Lisowska, 1981; Dahr, 1981; Anstee, 1981).

### **B: Description**

La glycophorine A est la plus importante des protéines transmembranaires de l'érythrocyte humain (Bretscher, 1971; Furthmayer, 1975). Elle est constituée de 131 amino-acides portant 16 chaînes oligosaccharidiques, 15 liées à un résidu sérine ou thréonine et une liée à l'asparagine (Tomita et Marchesi, 1975; Tomita et al., 1978). Sa masse molaire est de 31.000 daltons. Elle renferme environ 60 % de glycannes et est particulièrement riche en acide sialique: 25 %. La majeure partie des chaînes O-glycosidiques libérées par hydrolyse alcaline fournit un tétrasaccharide de structure :



Cette glycoprotéine transmembranaire comporte trois domaines :

- la séquence N terminale hydrophile, composée de 70 aminoacides, à l'extérieur de la membrane et portant les 16 chaînes glycaniques;
- une zone intermédiaire, très hydrophobe, contenant les aminoacides 71 à 92, associés aux lipides membranaires;
- la partie C terminale de la protéine tournée vers le cytoplasme et pouvant agir avec les éléments cytoplasmiques.

### **C - Caractérisation des glycophorines Cad et Sd<sup>a</sup>**

#### **C - 1 : Isolement et spécificité**

Cartron et Blanchard (1982) ont montré par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) que les principales glycoprotéines des membranes érythrocytaires de sujets Cad (du premier donneur, Monsieur Caddinouche) présentent une mobilité anormale. Elle se traduit par une augmentation de la masse moléculaire apparente de :

3.000 daltons pour la glycophorine A et

2.000 daltons pour la glycophorine B.

Du point de vue quantitatif, la distribution des glycoprotéines des érythrocytes Cad est similaire à celle des glycoprotéines des érythrocytes de groupe sanguin B pris comme contrôle (Dahr et al., 1976).

Le protocole expérimental de purification des composants membranaires (Fig.14, p.70), responsables des activités de groupes sanguins Cad et Sd<sup>a</sup> a été établi par Cartron et Blanchard (1982).

**C - 2 : Les chaînes oligosaccharidiques isolées de la glycophorine de sujets Cad.**

Le traitement alcalin en milieu réducteur de la glycophorine A du donneur Cad, libère six oligosaccharides qui ont pu être isolés et identifiés après méthylation et RMN du proton à 500 MHz (Blanchard et al., 1983; Herkt et al., 1985). La structure de quatre de ces oligosaccharide-alditols est la suivante :

oligo 1 : NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol

oligo 3 : GalNAc( $\beta$ 1-4)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)]Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol

oligo 5 : NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol

oligo 6 : GalNAc( $\beta$ 1-4)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)]Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol

L'oligosaccharide 6 est le constituant majeur. Les oligosaccharides 3 et 6 ne sont pas présents sur la glycophorine A des témoins étudiés et sont donc spécifiques du groupe sanguin Cad.

**D - Comparaison des chaînes O-glycosidiques de la glycophorine A provenant d'érythrocytes de groupe Sd(a-), Sd(a+) et Cad.**

Nous avons effectué une étude comparative des oligosaccharides alcali-labiles portés par la glycophorine A isolée d'érythrocytes Sd(a-), Sd(a+) et de deux autres donneurs Cad. Cette étude justifiée par l'association du déterminant Cad avec les sialoglyco-

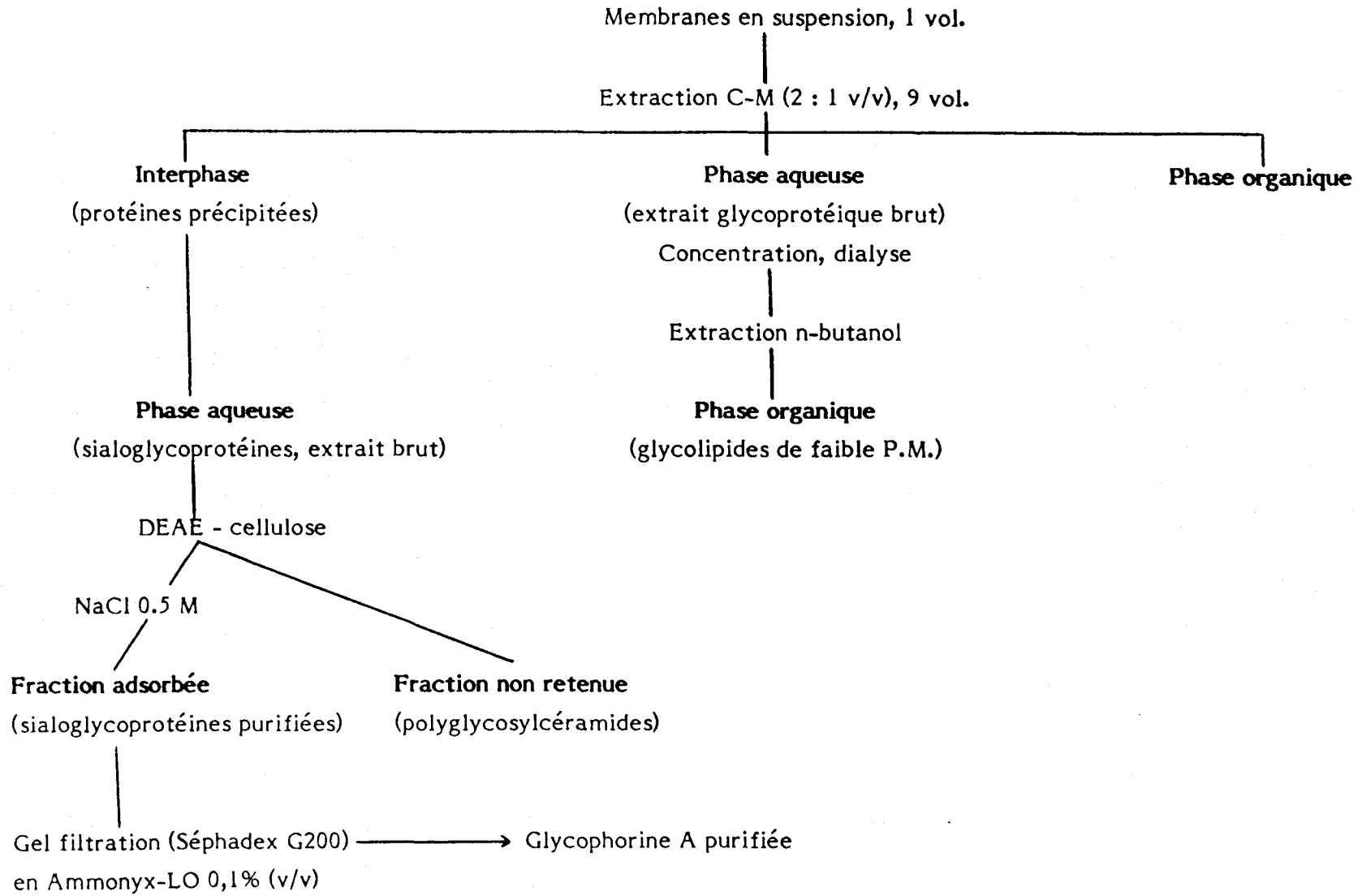


Fig 14 : Fractionnement des glycolipides et glycoprotéines de la membrane érythrocytaire

protéines et par la relation structurale des antigènes Cad et Sd<sup>a</sup> a fait l'objet de l'article suivant:

Article 1:

BLANCHARD, D., CAPON, C., LEROY, Y., CARTRON, J.-P. and FOURNET, B.

Comparative study of glycophorin A derived O-glycans from human Cad, Sd(a+) and Sd(a-) erythrocytes.

(1985a) *Biochem. J.* 232, 813-818.

## Comparative study of glycoporphin A derived O-glycans from human Cad, Sd(a+) and Sd(a-) erythrocytes

Dominique BLANCHARD,\* Calliope CAPON,† Yves LEROY,† Jean-Pierre CARTRON†‡ and Bernard FOURNET†

\*Unité INSERM U76, Centre National de Transfusion Sanguine, 6 rue Alexandre Cabanel, F-75739 Paris Cédex 15, France, and †Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Glycophorin A was purified from the erythrocyte membranes of blood group Cad, Sd(a+) and Sd(a-) donors and the oligosaccharide alditols, obtained after alkaline borohydride degradation, separated by h.p.l.c. on an alkylamine silica gel column, were characterized by sugar analysis. Structure determination of the major acid components by methylation analysis, g.l.c.-m.s. and <sup>1</sup>H-n.m.r. indicated that the three blood group Cad red cells under study (samples Cad., Bui. and Des.) carry the same pentasaccharide GalNAc(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GalNAc-ol (Cad determinant) but in different amounts. This pentasaccharide, however, was absent from glycophorin A of Sd(a+) and Sd(a-) donors, suggesting that the Sd<sup>a</sup> determinant is not associated with glycophorins. It was calculated that glycophorin A from the original Cad donor (Cad.) carries about 12 O-glycosidically linked pentasaccharide chains per molecule whereas only 2–3 of these chains were present in the samples from the two other unrelated Cad individuals (Bui. and Des.) It is well known from quantitative agglutination studies that the proportion of red cells which can be agglutinated by the *Dolichos biflorus* lectin varies from one Cad blood sample to another. Some are completely agglutinated (Cad. donor) whereas others are only partially agglutinated (Bui. and Des. donors) suggesting that some red cells might not carry the Cad determinants. From the results presented above and sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide-gel electrophoresis studies it is suggested that Cad red cells from Bui. and Des. do not carry a mixture of glycophorin A molecules with or without the Cad pentasaccharides but a spectrum of glycoprotein molecules with varying amounts of Cad determinants.

### INTRODUCTION

The blood group Cad antigen is a carbohydrate determinant carried both by sialoglycoproteins and gangliosides of the human red cell membranes (Cartron & Blanchard, 1982; Blanchard *et al.*, 1985). The major O-glycan isolated from Cad glycoproteins is a pentasaccharide of structure GalNAc(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GalNAc (Blanchard *et al.*, 1983) whereas glycophorin A from normal red cells carries predominantly a sialotetrasaccharide NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GalNAc (Thomas & Winzler, 1969). A novel ganglioside probably derived from sialosylparagloboside by addition of a βGalNAc residue was also recently identified on red cells from the original Cad donor as well as from two other unrelated Cad individuals (Blanchard *et al.*, 1985).

The Cad antigen is serologically and biochemically related to the Sd<sup>a</sup> blood group antigen. Indeed (i) Cad red cells are strongly agglutinated by human anti-Sd<sup>a</sup> serum (Sanger *et al.*, 1971) and both the glycoproteins and gangliosides isolated from Cad red cells inhibited this antiserum (Blanchard *et al.*, 1985; Herkt *et al.*, 1985), and (ii) the same terminal non-reducing trisaccharide, GalNAc(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal, has been characterized from Cad red cells and the Sd<sup>a</sup>-active glycoprotein (Tamm-Horsfall glycoprotein) from human urine

(Donald *et al.*, 1983). However, the red cell component(s) carrying the Sd<sup>a</sup> antigen has not yet been identified and the exact relationship between Cad and Sd<sup>a</sup> specificities is still obscure.

In this report we have analysed the alkali-labile oligosaccharides of glycophorin A purified from the red cells of two unrelated Cad donors and from individuals of Sd(a+) and Sd(a-) phenotype. We have also conducted some experiments in order to determine whether the mixed-field agglutination pattern observed after interaction between the *Dolichos biflorus* lectin and most of the Cad samples (Cazal *et al.*, 1971; Lopez *et al.*, 1975) represents a true mixture of antigen 'positive' and 'negative' red cells.

### MATERIALS AND METHODS

Neuraminidases from *Vibrio cholerae* (1 unit/ml) and from *Arthrobacter ureafaciens* (0.02 units/mg) were purchased from Behringwerke AG (Marburg/Lahn, Germany). *Dolichos biflorus* lectin was obtained from E.Y. Laboratories (Sochibo, Boulogne, France). NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> (16 Ci/mmol) was from CEA (Gif-sur-Yvette, France) and En<sup>3</sup>Hance from New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.). X-ray films (RX) were from Fuji. The amino-AS-5A (5 μm; 0.46 cm × 25 cm) h.p.l.c. column

Abbreviations used: SDS, sodium dodecyl sulphate; sialosylparagloboside, NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc-ceramide; GalNAc-ol, N-acetylgalactosaminitol.

‡ To whom requests for reprints should be sent.

**Table 1. Carbohydrate composition of glycophorin A purified from Cad, Sd(a+) and Sd(a-) erythrocytes and its  $\beta$ -elimination products**

Sugar analysis was performed as described by Zanetta *et al.* (1972) using a Varian 1400 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. Trifluoroacetyl derivatives of methylglycosides were separated on a glass column (300 cm  $\times$  0.3 cm) filled with OV-210 5% silicon on chromosorb W(HP) DMCS, 100–200 mesh. Nitrogen flow was 7.5 ml/min; the column temperature was raised from 100 °C to 210 °C at 2 °C/min.

Fraction	Molar ratio of carbohydrates					
	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol
Glycophorin A from donor:						
Cad.	1	0.20	1.58	0.29	1.58	—
Bui.	1	0.19	0.85	0.39	1.63	—
Sd(a+) or Sd(a-)	1	0.24	0.82	0.31	1.64	—
$\beta$ -Elimination products of glycophorin A from donor:						
Cad.	0.98	0	1.18	0	2.15	1
Bui.	1.28	0	0.24	0	2.48	1
Sd(a+)	0.78	0	0	0	1.81	1
Sd(a-)	0.68	0	0	0	1.90	1

was purchased from Touzart et Matignon (Vitry-sur-Seine, France).  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99.96 atom%  $^2\text{H}$ ) was from Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). Sd(a-) and Sd(a+) red cells were collected from blood donors at the Centre National de Transfusion Sanguine (Paris, France). Red cells from the original Cad individual (Cad., group B) (Cazal *et al.*, 1968) were kindly provided by Mme Monis, Centre de Transfusion Sanguine de Montpellier, France. Two other Cad positive samples (Bui., group B; Des., group O) were obtained through the courtesy of Dr. Guimbretière and Dr. Assan (Centres de Transfusion Sanguine de Nantes and Cannes, France, respectively).

Lipid-free glycophorin A from Sd(a-), Sd(a+) and Cad red cells was obtained by following a published procedure (Cartron & Blanchard, 1982). O-Glycosidically linked oligosaccharides were released by alkaline borohydride treatment (Blanchard *et al.*, 1983). Oligosaccharide alditols were desalted on a Bio-Gel P-6 column (1.5 cm  $\times$  90 cm) equilibrated in 0.5% acetic acid and further fractionated by h.p.l.c. on an Amino-AS-5A column according to Herkt *et al.* (1985). Characterization of the purified oligosaccharide alditols was achieved by t.l.c., analysis of carbohydrate composition and g.l.c.-m.s. as described (Herkt *et al.*, 1985).  $^1\text{H}$ -n.m.r. spectroscopic analysis was performed after repeated exchange in  $^2\text{H}_2\text{O}$  using a Bruker spectrometer operating at 400 MHz in the Fourier transform mode at probe temperature of 285 and 300 K.

Purified glycophorin A (50  $\mu\text{g}$ ) was incubated overnight with 0.01 unit of *Vibrio cholerae* neuraminidase in 50  $\mu\text{l}$  of 0.05 M-acetate buffer, pH 5.5, containing 0.009 M-CaCl<sub>2</sub> (buffer A) at 37 °C. The glycoproteins were then treated for 15 min at 37 °C with 0.01 M-sodium metaperiodate, reduced with 150  $\mu\text{Ci}$  of NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> for 30 min at room temperature and desalted by passage over a column of Sephadex G-50 (1.5 cm  $\times$  15 cm) equilibrated and developed in 0.5% acetic acid. Fractions (0.5 ml) were monitored by counting an aliquot in a liquid-scintillation counter and analysed by SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis as described below.

Intact red cells were treated with increasing amounts (0–1 unit/ml) of neuraminidase either from *Vibrio cholerae* or from *Arthrobacter ureafaciens*. Following 30 min incubation at 37 °C the supernatant obtained by centrifugation (1500 g, 10 min) was filtered through a Millipore filter (0.45  $\mu\text{m}$ ) and submitted to sialic acid analysis (Warren, 1959).

Untreated or neuraminidase-treated cells (*Vibrio cholerae*; 0.1 unit/ml) were labelled with NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> after periodate oxidation according to Gahmberg & Anderson (1977).

Membranes were obtained by hypo-osmotic lysis (Steck & Kant, 1974), solubilized in SDS and submitted to SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). Sialoglycoproteins were revealed by periodate/Schiff staining (Fairbanks *et al.*, 1971) or by fluorography performed by incubating the gel in En<sup>3</sup>Hance scintillation cocktail and exposure to X-ray film at -80 °C. Inhibition-hemagglutination tests with human anti-Sd<sup>a</sup> serum (Dr. Messeter, Lund, Sweden) were performed in microtitre plates as described before (Cartron & Blanchard, 1982).

## RESULTS

### Biological activity of glycophorin A from Cad, Sd(a+) and Sd(a-) red cells

Preliminary experiments using agglutination-inhibition tests indicated that the glycophorin A purified from the original Cad donor (Cad.) inhibited strongly the agglutination of Cad erythrocytes (donor Des.) by the human anti-Sd<sup>a</sup> antibody (0.12  $\mu\text{g}$  dry wt./40  $\mu\text{l}$  total volume). About 25 times more glycophorin (3.10  $\mu\text{g}$ ) from another Cad individual (donor Bui.) was required for complete inhibition of this antibody. The preparations from Sd(a+) and Sd(a-) red cells were inactive at the concentration used (> 50  $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ ), suggesting that the Sd<sup>a</sup> determinant is not present on the glycophorin A molecules from these donors.

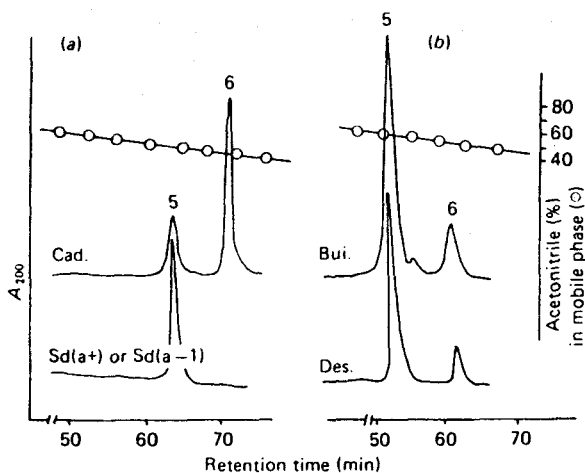


Fig. 1. Separation by h.p.l.c. of the oligosaccharide alditols obtained after alkaline borohydride treatment of glyophorin A from Cad (Cad., Bui., Des.), Sd(a+) and Sd(a-) donors

$\beta$ -Elimination products, desalted on a Bio-Gel P-6 column (90 cm  $\times$  15 cm) equilibrated in 0.5% acetic acid, were injected on an Amino AS 5A (0.4 cm  $\times$  25 cm, 5  $\mu$ m) h.p.l.c. column. Separation occurred at 1 ml/min by isocratic elution for 25 min in acetonitrile/15 mM-phosphate buffer, pH 5.2 (4:1, v/v) followed by a linear gradient in which the ionic strength of the buffer increased at the rate of 0.6% (v/v) per minute. Sugars were detected by u.v. absorbance at 200 nm. Only the relevant part of the elutions patterns (retention time 50–80 min) showing the separation of oligosaccharide 5 {NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol} from oligosaccharide 6 {GalNAc( $\beta$ 1-4)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)]Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol} are presented.

#### Carbohydrate composition of glyophorin A prepared from Cad, Sd(a+) and Sd(a-) red cells

We have shown earlier that the GalNAc content was much higher in glyophorin A isolated from the donor Cad. than from Cad-negative red cells (Cartron & Blanchard, 1982). The ratio NeuAc:GalNAc was 2.0 for Cad-negative cells but only 1.0 for Cad-positive cells. However, the carbohydrate analysis of a glyophorin A preparation from the Cad-positive donor Bui. did not show a significant increase in GalNAc content as compared with glyophorin samples from Sd(a+) and Sd(a-) donors (Table 1). Since the content of other sugars is similar in these samples it is suggested that only a few numbers of Cad pentasaccharides are present on Bui. erythrocytes.

#### Analysis of oligosaccharide alditols obtained by alkaline borohydride cleavage of glyophorin A

The oligosaccharide alditols released by alkaline borohydride degradation of glyophorin A preparation from Cad, Sd(a+) and Sd(a-) red cells were submitted to sugar analysis.

As shown in Table 1, the sugar-alditols isolated from Cad donors Bui. and Cad. after  $\beta$ -elimination contain GalNAc in addition to GalNAc-ol. The relative amount of GalNAc was 5 times higher in the Cad. sample as compared to the Bui. sample. A low amount of GalNAc

was also present in the  $\beta$ -elimination products from Des., another Cad individual (results not shown). On the other hand, unreduced GalNAc was not detectable in the oligosaccharide alditols isolated from Sd(a+) and Sd(a-) red cells.

Analysis of the oligosaccharide alditols from Cad. glyophorin A by h.p.l.c. on an alkylamine silica gel column resulted in the separation of six major acidic oligosaccharides (Herkt *et al.*, 1985). The disialylated components were identified as the sialotetrasaccharide and the Cad-specific pentasaccharide (Blanchard *et al.*, 1983) (oligosaccharides 5 and 6, respectively, Fig. 1a). When  $\beta$ -elimination products of glyophorin A from Sd(a-) or Sd(a+) erythrocytes were submitted to this separation procedure only the tetrasaccharide (oligosaccharide 5) was identified (Fig. 1a). We were unable to detect any oligosaccharide with a retention time corresponding to that of the Cad-specific pentasaccharide (oligosaccharide 6) even using the highest u.v. absorbance

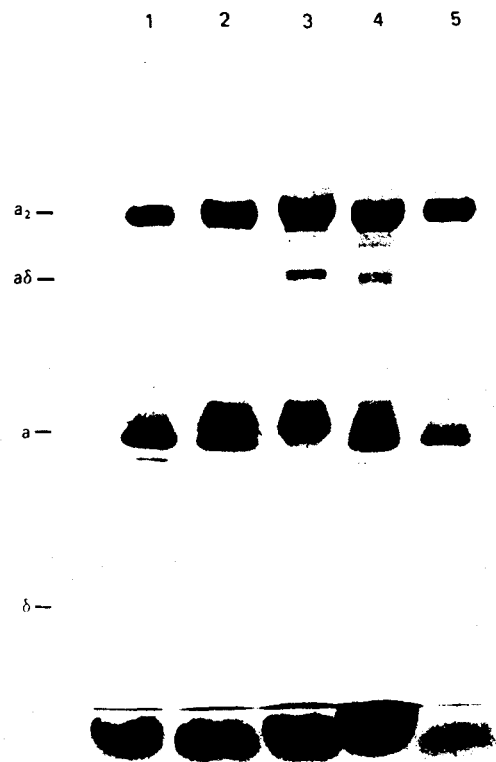


Fig. 2. Polyacrylamide-gel electrophoresis of red cell membranes from control and Cad erythrocytes

About 150  $\mu$ g of membrane protein solubilized in 10 mM-Tris/HCl, pH 6.8, containing 1 mM-EDTA and 5% SDS was loaded on the gel. Electrophoresis was performed at 40 mA constant current on a 1.5 mm thick gel slab containing 10% (w/v) acrylamide and 0.27% (w/v) bisacrylamide with a stacking gel of 3% (w/v) in the discontinuous buffer of Laemmli (1970). The gel was stained by the periodate/Schiff procedure (Fairbanks *et al.*, 1971). Membranes are: 1, control; 2, mixture of control (75  $\mu$ g) and Cad. (75  $\mu$ g); 3, Cad.; 4, Bui.; 5, Des. Nomenclature of sialoglycoproteins according to Anstee *et al.* (1979);  $\alpha_2$  and  $\alpha$ , respectively the dimer and monomer of glyophorin A;  $\delta$ , monomer of glyophorin B;  $\alpha\delta$ , heterodimer of glyophorins A and B.



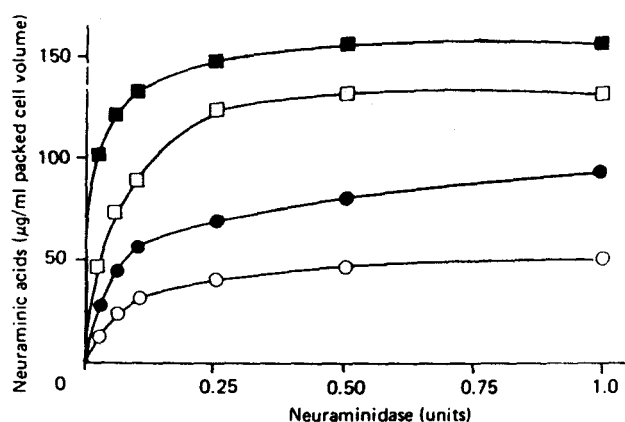


Fig. 3. Enzymic removal of sialic acids from control and Cad. red cells

Cad. (○, ●) and control (□, ■) red cells were submitted to neuraminidase from *Vibrio cholerae* (■, ●) and *Arthrobacter ureafaciens* (□, ○) as described in the Materials and methods section. Sialic acid liberated in the supernatants was determined by the Warren (1959) procedure.

sensitivity. The analysis of the oligosaccharide alditols from other Cad samples (Bui. and Des.) gave a similar qualitative pattern (Fig. 1b) as compared with the original Cad pattern (Fig. 1a). However, the quantitative ratio of penta- versus tetrasaccharide (oligosaccharide 6 versus 5) was strikingly different. The ratio of oligosaccharide 6 to oligosaccharide 5 was 3.40 for Cad. and only 0.20 and 0.17 for Bui. and Des., respectively. The structure of oligosaccharides 5 and 6 were confirmed by g.l.c.-m.s. and  $^1\text{H-n.m.r.}$  analysis and shown to be identical with those identified previously (Herkt *et al.*, 1985). The heterogeneity observed on the oligosaccharide ratios was also noted when agglutination tests were performed with the *Dolichos biflorus* lectin, since red cells from Des. and Bui. showed a mixed-field agglutination with about 60% and 50%, respectively, of agglutinated erythrocytes whereas red cells from the original Cad donor (Cad.) were completely agglutinated.

Since we have analysed the alkali-labile oligosaccharides from glycoprotein A of the whole red cell population from Bui. and Des. we have no information on the distribution of the pentasaccharides among glycoprotein A molecules. The mixed-field agglutination suggested that some erythrocytes carry glycoprotein A with tetrasaccharides (Cad-negative cells) whereas other cells carry mainly alkali-labile pentasaccharides (Cad-positive cells). In order to test this hypothesis we investigated the periodate/Schiff profile of membrane preparations from several Cad individuals after SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis.

#### SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis of erythrocyte membrane glycoproteins

It is known that glycoproteins A and B from donor Cad. show a decreased mobility in SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis corresponding to an increase in the molecular mass of 3 and 2 kDa respectively (Cartron & Blanchard, 1982; Fig. 2, lane 3). When a mixture of Cad-positive (Cad. donor) and Cad-negative membranes is prepared and analysed by gel electrophoresis, two

well-separated bands of glycoprotein A (band  $\alpha$ ) as well as glycoprotein B (band  $\delta$ ) monomer are resolved (Fig. 2, lane 2). However, only one band in the regions of glycoprotein A and B is detectable with the Bui. and Des. samples (Fig. 2, lanes 4 and 5) suggesting that these red cells do not carry two distinct populations of glycoproteins.

Taking advantage of the observation that sialic acids from Cad. donor red cells are partially resistant to neuraminidases from *Vibrio cholerae* and *Arthrobacter ureafaciens* (Fig. 3) we studied the incorporation of  $^3\text{H}$  (from  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ ) into preparations of glycoprotein A from Sd(a-) and Cad samples after neuraminidase treatment and periodate oxidation. Incorporation of  $^3\text{H}$  was low in periodate-treated glycoprotein A from Sd(a-) cells (400 c.p.m./ $\mu\text{g}$ ) when compared with the radioactivity incorporated into sialic acid residues still present on sialoglycoproteins from Bui. (1200 c.p.m./ $\mu\text{g}$ ) or Cad (2700 c.p.m./ $\mu\text{g}$ ). SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis showed that the  $^3\text{H}$  label incorporated into Sd(a-) cells migrated as broad bands (Fig. 4, lane 1) the mobility of which was clearly distinct from those identified in Cad glycoprotein (Fig. 4, lane 3). In addition, the bands from the Sd(a-) sample were faint whereas those from donor

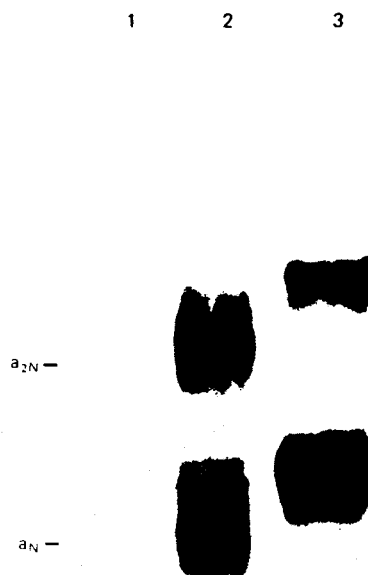


Fig. 4. Polyacrylamide-gel electrophoresis of  $^3\text{H}$ -labelled glycoprotein A preparation from Cad and Sd(a-) individuals

Neuraminidase-treated and  $^3\text{H}$ -labelled glycoprotein A from Sd(a-), Bui. and Cad. donors were loaded on a 10% (w/v) polyacrylamide gel as described in the legend to Fig. 2. The gel was treated for fluorography, dried on a filter paper and exposed to Fuji RX film. Neuraminidase-treated glycoprotein A was from: 1, Sd(a-); 2, Bui.; 3, Cad.  $\alpha_{2N}$  and  $\alpha_N$  stand for desialylated glycoprotein A ( $\alpha$ ) dimeric and monomeric forms respectively.

Cad. were of strong intensity and migrated clearly, as expected for glycoprotein A dimer and monomer. Interestingly, the glycoprotein A from Bui. is seen as diffuse bands with an intermediate mobility and intensity (Fig. 4, lane 2).

Very similar results were obtained after labelling of neuraminidase-treated red cells, indicating that glycoprotein A from Cad. is also strongly labelled and displays an abnormal mobility whereas glycoprotein B from Bui. and Des. is less intensely labelled and migrates as a broad band (results not shown).

## DISCUSSION

On human red cell glycoproteins the blood group Cad determinant is associated with alkali-labile pentasaccharides of which the structure has been recently elucidated (Blanchard *et al.*, 1983). The presence of a  $(\beta 1-4)\text{GalNAc}$  residue on these sugar chains results in the resistance of the  $(\alpha 2-3)$ -linked sialic acids to hydrolysis by neuraminidases from *Vibrio cholerae* and *Arthrobacter ureafaciens*. This phenomenon is also observed with the  $\text{GM}_2$  ganglioside which contains a closely related terminal non-reducing sequence (Harris & Thornton, 1978). In addition, the terminal  $\beta\text{GalNAc}$  unit provides the resistance of the Cad red cells towards infestation *in vitro* by the malarial parasite *Plasmodium falciparum* (Cartron *et al.*, 1983). The findings described above were obtained using the red cells from the first case of Cad erythrocytes (Cad. donor) described by Cazal *et al.* (1968). In this report, we have provided further studies on two unrelated cases of Cad samples (Des. and Bui.) and both immunological as well as biochemical analysis demonstrate that these erythrocytes carry the same oligosaccharide determinants present on Cad. red cells, but in lower amount. The ratio of pentasaccharide versus sialotetra-saccharide was higher on glycoprotein A from the original Cad sample (value 3.40) than on glycoprotein A from Bui. and Des. (value 0.20 and 0.17 respectively).

Since glycoprotein A carries 15 alkali-labile sialotetra-saccharide chains (Tomita *et al.*, 1978) we calculated that glycoprotein A from the original Cad. donor carries about 12 pentasaccharide structures whereas the same calculation gives 2–3 GalNAc-containing oligosaccharide chains per molecule of glycoprotein A from Bui. or Des. Analysis of chymotryptic peptides derived from the glycoprotein A of Bui. red cells showed that, in contrast to the observation on  $\text{M}_1$  reactive red cells where the additional GlcNAc residues are mainly present on sugar chains located in the *N*-terminal region of the molecule (Baumeister *et al.*, 1981), the additional GalNAc residues responsible for blood group Cad specificity are randomly distributed among alkali-labile oligosaccharides (W. Dahr, D. Blanchard & J. P. Cartron, unpublished work). Polyacrylamide-gel electrophoresis suggests that Cad erythrocytes from Bui. or Des., which exhibited a mixed-field agglutination pattern with the *Dolichos biflorus* lectin, carry a spectrum of glycoprotein A molecules substituted by variable amounts of GalNAc residues and not a mixture of GalNAc-positive and GalNAc-negative molecules. These results correlate with serological studies showing that there are no distinct subpopulations of Cad erythrocytes, since part of the separated Cad-negative cells are again agglutinated by the *Dolichos biflorus* lectin (D. Blanchard & J. P. Cartron,

unpublished work). This finding is clearly different from the true mixed-field seen with Tn red cells, where there are two distinct subpopulations of cells, Tn-positive and Tn-negative, the latter being unagglutinable by Tn-specific reagents (Cartron *et al.*, 1980).

The  $\text{Sd}^a$  blood group determinant was identified as a carbohydrate structure carried by the urinary Tamm-Horsfall glycoprotein (Donald *et al.*, 1983). It shares with the Cad determinant the  $\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]\text{-Gal}$  sequence which explains the strong reactivity of Cad cells with the anti- $\text{Sd}^a$  antibody (Sanger *et al.*, 1971). The results presented in this study show that glycoprotein A from  $\text{Sd}(a+)$  cells does not carry detectable amounts of the pentasaccharides present on Cad red cells. From recent findings we suggest that the  $\text{Sd}^a$  determinant of the red cells might be carried by red cell gangliosides rather than glycoproteins (Blanchard *et al.*, 1985). It is therefore expected that the  $(\beta 1-4)\text{GalNAc}$  transferases involved in biosynthesis of Cad and  $\text{Sd}^a$  antigens might also be different.  $(\beta 1-4)\text{GalNAc}$  transferases were recently reported in guinea-pig kidney (Serafini-Cessi & Dall'Olio, 1983) and in a murine cytotoxic T-cell line (Conzelmann & Kornfeld, 1984) and both enzymes were able to transfer [ $^{14}\text{C}$ ]GalNAc from UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]GalNAc to human glycoprotein as expected for the blood group Cad enzyme. However, experiments from our group (Piller *et al.*, 1985) suggest that the  $(\beta 1-4)\text{GalNAc}$  from human kidney has a different substrate specificity since it is inactive towards native or partially desialylated and/or resialylated glycoprotein A preparations. Further studies are required to identify the biochemical basis of  $\text{Sd}^a$  specificity.

We are indebted to Mme M. Monis, Dr. L. Guimbretière and Dr. Assan (Centres de Transfusion Sanguine de Montpellier, Nantes and Cannes respectively) for providing us with the blood samples from Cad erythrocytes, to J. M. Wieruszkeski (Université des Sciences et Techniques de Lille I, France) for  $^1\text{H-n.m.r.}$  analysis and to Mme M. Huet for valuable technical assistance.

## REFERENCES

- Anstee, D. J., Mawby, W. J. & Tanner, M. J. A. (1979) *Biochem. J.* **183**, 193–203
- Baumeister, G., Dahr, W., Beyreuther, K., Moulds, J., Judd, J., Issitt, P. & Krüger, J. (1982) *Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin und Immunhaematologie* (Nagel, V. & Stangel, W., eds.), vol. 8, pp. 121–125, Medicus Verlag, Berlin
- Blanchard, D., Cartron, J. P., Fournet, B., Montreuil, J., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 7691–7695
- Blanchard, D., Piller, F., Gillard, B., Marcus, D. & Cartron, J. P. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7813–7816
- Cartron, J. P. & Blanchard, D. (1982) *Biochem. J.* **207**, 497–504
- Cartron, J. P., Nurden, A. T., Blanchard, D., Lee, H., Dupuis, D. & Salmon, C. (1980) *Blood Transf. Immunohematol.* **23**, 613–628
- Cartron, J. P., Prou, O., Luilier, M. & Soulier, J. P. (1983) *Br. J. Haematol.* **55**, 639–647
- Cazal, P., Monis, M., Caubel, J. & Brives, J. (1968) *Rev. Fr. Transf.* **11**, 209–221
- Cazal, P., Monis, M. & Bizot, M. (1971) *Rev. Fr. Transf.* **14**, 321–334
- Conzelmann, A. & Kornfeld, S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12536–12542

- Donald, A. S. R., Yates, A. D., Soh, C. P. C., Morgan, W. T. J. & Watkins, W. M. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 625-631
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. H. (1971) *Biochemistry* **10**, 2606-2617
- Gahmberg, C. G. & Andersson, L. C. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5888-5894
- Harris, P. L. & Thornton, E. R. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6738-6745
- Herkt, F., Parente, J. P., Leroy, Y., Fournet, B., Blanchard, D., Cartron, J. P., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1985) *Eur. J. Biochem.* **146**, 125-129
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-682
- Lopez, M., Gerbal, A., Bony, V. & Salmon, C. (1975) *Vox Sang* **28**, 305-313
- Piller, F., Blanchard, D., Huet, M. & Cartron, J. P. (1985) *Carbohydr. Res.*, in the press
- Sanger, R., Gavin, J., Tippett, P., Teesdale, P. & Eldon, K. (1971) *Lancet* **i**, 1130
- Serafini-Cessi, F. & Dall'Olio, F. (1983) *Biochem. J.* **215**, 483-489
- Steck, T. L. & Kant, J. A. (1974) *Methods Enzymol.* **31**, 172-180
- Thomas, D. B. & Winzler, R. J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 5943-5946
- Tomita, M., Furthmayr, H. & Marchesi, V. T. (1978) *Biochemistry* **17**, 4756-4770
- Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 1971-1975
- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* **69**, 291-304

---

Received 1 July 1985/12 August 1985; accepted 21 August 1985

## E : Conclusions

1 - L'analyse structurale des chaînes oligosaccharidiques de la glycophorine A isolée des membranes érythrocytaires provenant de deux donneurs Cad (Bui. et Des.) a permis de montrer la présence des oligosaccharides 5 et 6 caractérisés chez le premier donneur Cad (Blanchard et al., 1983; Herkt et al., 1985).

Cependant, la proportion de ces oligosaccharides est différente selon l'origine des échantillons Cad (Fig.1, article 1). En effet, alors que l'oligosaccharide 6 est le composant majeur de la glycophorine A du premier donneur Cad (rapport oligo 6/oligo 5 égal à 3.4), c'est l'oligosaccharide 5 qui prédomine chez les donneurs Bui. et Des. (rapports respectivement égaux à 0.20 et 0.17).

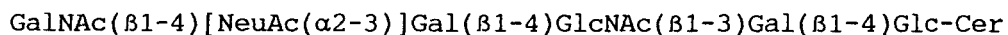
En considérant que l'oligosaccharide 6 qui possède l'activité Cad est distribué de façon uniforme sur la chaîne polypeptidique, 2 ou 3 sites de O-glycosylation par molécule de glycophorine A, sont occupés par le déterminant pentasaccharidique Cad. Par contre sur les érythrocytes du premier donneur Cad, 12 des 15 sites de glycosylation sont occupés par le déterminant Cad.

2 - Les tests d'agglutination par la lectine de Dolichos biflorus varient d'un échantillon à un autre. Les érythrocytes du premier donneur Cad sont totalement agglutinés alors que ceux des donneurs Bui. et Des. ne le sont que partiellement.

Les érythrocytes Cad des donneurs Bui. et Des. ne constituent pas un mélange de molécules de glycophorine A, portant ou non, les pentasaccharides caractéristiques du déterminant Cad puisqu'il n'a pas été possible de détecter par électrophorèse en gel de polyacrylamide deux populations de glycophorine distinctes (Fig. 2, article 1). On peut penser alors qu'il existerait à la surface des érythrocytes, une distribution hétérogène du nombre des sites antigéniques. Les catégories Cad 2 et Cad 3 définies par Casal et al. (1971) résulteraient de la présence en quantité variable, de pentasaccharides portant le déterminant antigénique.

3 - Ce pentasaccharide est toutefois absent de la glycophorine A des donneurs Sd(a+) et Sd(a-) suggérant que le déterminant Sd<sup>a</sup> n'est pas associé à la glycophorine.

L'inhibition de la lectine de Dolichos biflorus par un extrait glycolipidique des membranes du donneur Cad ainsi que des études sérologiques basées sur la résistance aux protéases des déterminants Cad et Sd<sup>a</sup> ont montré que des composés de nature glycolipidique participeraient également aux activités Cad et Sd<sup>a</sup>. Ces observations ont permis la mise en évidence d'un nouveau ganglioside (Blanchard et al., 1985b) dérivant du sialylparagloboside SPG, ganglioside principal des érythrocytes de donneurs témoins (Cad-). Ce nouveau ganglioside possède un résidu GalNac supplémentaire et sa chaîne glucidique présente une analogie structurale avec les oligosaccharides déjà isolés de la glycophorine A du donneur Cad et de la glycoprotéine de Tamm-Horsfall présente dans les urines Sd(a+) :



La réactivité antigénique des érythrocytes Sd(a+) est donc associée à des gangliosides présents en très faible quantité, impliquant une densité de sites antigéniques peu élevée, qui correspond bien à l'agglutination partielle et de faible intensité des érythrocytes Sd(a+) par les anti-Sd<sup>a</sup>.

Piller et al. (1986) ont identifié une  $\beta$ -N-acétylgalactosaminyltransférase dans le rein humain analogue à celle mise en évidence dans les extraits de reins de Cobaye et de lymphocytes T cytotoxiques de Souris (Serafini-Cessi et Dall'Olio, 1983; Conzelmann et Kornfeld, 1984a et b). Ils ont montré que l'accepteur pour le résidu GalNac n'était pas la glycophorine A mais le sialylparagloboside et que la  $\beta$ -N-acétylgalactosaminyltransférase pouvait être le produit direct du gène Sd<sup>a</sup>. La transférase responsable de la biosynthèse de l'antigène Cad est sans doute différente puisqu'elle utilise à la fois le SPG et les glycoprotéines comme substrats.

## II - LES MUCINES URINAIRES

### A - Introduction

En 1982, Cartron et al. isolent à partir d'urines d'individus de groupe sanguin O, une mucine possédant l'activité de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> par chromatographie d'affinité sur colonne HPA-ultragel. Les auteurs purifient 8mg de mucines à partir de 100 litres d'urines. Cette molécule qui possède une masse apparente de 340.000 daltons, est résolue en une seule bande par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS après révélation au réactif de Schiff et oxydation périodique. Cette molécule n'est pas révélée par le bleu de Coomassie.

La composition en sucre de cette glycoprotéine indique la présence de quantité importante de N-acétylgalactosamine, l'absence de mannose et des rapports molaires en galactose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine et acide sialique de 2:2:1:2, respectivement. Sa composition en aminoacides par les concentrations élevées en sérine, thréonine, proline et alanine, caractérise une substance de type "mucine". Cette mucine urinaire réagit avec les anticorps anti-Sd<sup>a</sup> aussi fortement que la glycoprotéine de Tamm-Horsfall isolée d'urines Sd(a+). Cependant, ces deux molécules présentent des compositions et des propriétés différentes.

A partir de cette mucine, nous avons voulu isoler la partie glycanique porteuse de l'activité de groupe sanguin Sd(a+).

### B : Matériels et méthodes

#### B - 1 : Préparation de la mucine

Le fractionnement et la purification d'urines d'individus de groupe sanguin O, ont été effectués au CNTS selon le protocole expérimental de Cartron et al. (1982).

#### B - 2 : Hydrolyse alcaline des chaînes glycaniques

Les chaînes glycaniques de la mucine ont été libérées par  $\beta$ -élimination :

10 mg de mucines sont traitées par 20 ml de potasse 0,2 M renfermant du borohydrure de potassium 1 M à 45°C pendant 40 heures.

Après neutralisation à l'aide de résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 25-50 mesh, forme H<sup>+</sup>) l'hydrolysate est évaporé trois fois en présence de méthanol pour éliminer les borates.

### **B - 3 : Purification des oligosaccharide-alditols**

L'hydrolysate repris par 1 ml d'eau distillée est chromatographié sur colonne de Biogel P-6 (1x87 cm). Les oligosaccharides élués par de l'acide acétique 0,5 % à un débit de 10 ml/heure, sont détectés en U.V. à 206 nm.

### **B - 4 : Tests d'agglutination par les lectines et les anticorps**

Les tests d'agglutination par les lectines et les anticorps effectués sur la mucine native et les fractions obtenues par  $\beta$ -élimination ont été réalisés au CNTS selon les protocoles expérimentaux décrits par Blanchard (1986).

L'agglutination des érythrocytes par les lectines s'effectue en plaque de microtitration. On dépose dans les puits en forme de U 20  $\mu$ l de lectine diluée en eau physiologique (dilution géométrique de raison 2 à partir d'une solution mère en général à 0,2 mg/ml) et 20  $\mu$ l d'une suspension érythrocytaire à 2 % (v/v). Après incubation 1 heure à température ambiante l'agglutination est lue, sur lame, au microscope.

Le sérum anti-Sd<sup>a</sup> utilisé (don du Dr Messeter, Lund, Suède) possède une agglutinine anti-B et ne peut être utilisé, en test d'agglutination direct, qu'avec des hématies Cad<sup>+</sup> de groupe A ou O. Le test se fait de façon identique à celui décrit ci-dessus en remplaçant les lectines par l'anticorps dilué à partir de sérum pur.

Les érythrocytes Sd(a<sup>+</sup>) peuvent être agglutinés par l'anti-Sd<sup>a</sup> par la technique utilisant une antiglobuline (test de Coombs indirect). Pour ce faire, 25  $\mu$ l de suspension globulaire à 5 % sont

incubés, dans un tube à hémolyse de 5 ml, avec 25 µl d'anticorps dilué de 1:1 à 1:6 (v/v) pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages en NaCl 0,15 M, 50 µl d'antiglobuline possédant une forte activité anti-complément (don du Dr Sondag, Liège, Belgique) sont ajoutés au culot globulaire. Le tube est centrifugé (1000 rpm pendant 1 minute) et l'agglutination est lue sur lame, au microscope.

#### B - 5 : Composition molaire en monosaccharides

Les compositions en monosaccharides ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse (MeOH/HCl 0,5 M); N-réacétylation et triméthylsilylation selon le protocole expérimental de Kamerling et al. (1975) modifié par Montreuil et al. (1986).

#### C - Résultats

L'hydrolyse alcaline en milieu réducteur de 10 mg de mucine a fourni par gel filtration sur Biogel P-6 deux fractions. Une fraction exclue (FI) et une fraction incluse (FII). La composition molaire en monosaccharides de ces deux fractions ainsi que les rendements en sucres sont reportés dans le Tableau VII (p.77). Sur la base de la nature des monosaccharides : traces de mannose et présence de GalNAc-ol, la fraction II correspond aux glycanes liés O-glycosidiquement à la protéine. Les résultats que nous obtenons, montrent quelques différences avec ceux de Cartron et al. (1982) par la présence de fucose et de mannose qui n'avaient pas été détectés dans les premières analyses de sucres des mucines urinaires.

Les tests d'inhibition réalisés sur chacune des fractions indiquent que la fraction légère FII inhibe le sérum anti-Sd<sup>a</sup> d'avantage que la fraction FI. En conséquence, le déterminant antigénique Sd<sup>a</sup> : GalNAc(β1-4)[NeuAc(α2-3)]Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal- serait porté préférentiellement par les O-glycanes dans la mucine urinaire alors que dans la glycoprotéine de Tamm-Horsfall se sont les N-glycanes qui sont responsables de cette activité (Donald et al., 1984).

Les faibles rendements de la β-élimination (libération de 11 % de sucres) et le peu de matériel de départ (10 mg de mucine) nous ont



TABLEAU VII

COMPOSITION MOLLAIRE ET POIDS DES FRACTIONS OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE SUR BIO-GEL P-6, DES OLIGOSACCHARIDES DES MUCINES URINAIRES, DETACHES PAR HYDROLYSE ALCALINE.

Fractions	Rapports molaires							Poids (mg)
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol	
F native	0.3	1	0.3	0.3	0.8	0.3	-	10
FI	0.4	1	0.6	0.2	1.4	0.4	-	0.35
FII	0.3	1	0.1	0.2	0.9	0.6	0.3	0.40

On prend le rapport molaire du galactose (Gal) égal à 1.

malheureusement empêchés d'obtenir des résultats exploitables sur la séparation et l'identification d'oligosaccharide-alditols par chromatographie liquide haute pression.

### III - LES MUCINES MECONIALES

#### A - Introduction

Le méconium se définit comme les premières selles expulsées par le nouveau-né dans les 24 heures qui suivent sa naissance. Le matériel stérile, verdâtre et inodore renferme des quantités élevées d'oligosaccharides et de glycoprotéines de type "mucine" qui se trouvent en relation directe avec le métabolisme des antigènes tissulaires. Les lipides et les protéines sont présents en faible quantité, les protéines solubles, comme l'albumine, dérivent des sécrétions intestinales et du liquide amniotique (Young et al., 1958). Le méconium est également composé d'éléments d'origine biliaire et intestinale qui participent à la circulation entéro-hépatique (Kinsella et Francis, 1971). Les débris tissulaires rencontrés proviennent de cellules desquamées de la bouche, de la peau, du tractus digestif et du "vernix caseosa" (Smith, 1959).

70 à 80% de la matière sèche du méconium (Harries J.T., 1978) est composée de glycoprotéines du mucus. La fraction soluble contient 80% des glucides totaux, avec une proportion en monosaccharides, similaire à celle du matériel de départ. Fraser et Clamp (1979) ont isolé deux fractions glycoprotéiniques, l'une de haut poids moléculaire ne contient pas de mannose, tandis que la seconde de poids moléculaire plus faible en renferme. Les glycoprotéines de haut poids moléculaire présentent de nombreuses chaînes glycaniques liées O-glycosidiquement. La composition en aminoacides de ces glycoprotéines est caractéristique : la serine et la thréonine sont les aminoacides essentiellement rencontrés dans la chaîne peptidique.

Les études biochimiques réalisées sur le méconium ont permis d'isoler des substances à activité de groupes sanguins ABH, MN, Lewis, spécifiques à l'enfant, et de caractériser le déterminant antigénique Sd<sup>a</sup> (Morton et al., 1970). Ce matériel représente donc une source importante d'antigènes foetaux.

Deux groupes de recherche se sont penchés sur l'isolement et l'étude structurale des glycanes issus des glycoprotéines du méconium.

Strecker, en 1981, isole 15 oligosaccharides provenant du catabolisme des O- et N-glycoprotéines (Herlant-Peers et al.). Sur la base des séquences oligosaccharidiques, les auteurs proposent que les enzymes suivantes : l'endo-N-acétyl- $\alpha$ -D-galactosaminidase, l'endo- $\beta$ -D-galactosidase et l'endo-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, interviennent dans la libération de ces oligosaccharides. Poursuivant leurs travaux, Strecker et ses collaborateurs décrivent la structure primaire de 12 glycoasparagines isolés du méconium (Cache et al., 1987). Ces structures se caractérisent par la présence de fucose en liaison ( $\alpha$ 1-6) sur la N-acétylglucosamine, conjuguée à l'asparagine. Ce résultat expliquerait la faible activité de l'( $\alpha$ 1-6)fucosidase dans l'intestin foetal.

Le groupe de Ten Feizi s'est intéressé aux glycanes des O-glycosylprotéines et plus particulièrement à la fraction dépourvue d'activité I/i. Après hydrolyse partielle qui élimine l'acide sialique et le fucose, les auteurs isolent par hydrolyse alcaline en milieu réducteur 9 fractions glucidiques dont ils déterminent la séquence à l'aide de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire du proton à 500 MHz.

Les motifs glucidiques ainsi isolés portent les déterminants antigéniques T: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc et Tn: GalNAc qui sont connus pour être associés à des antigènes tumoraux de certains adéno-carcinomes (Springer, 1984; Picard et Feizi, 1983 et 1984).

Ces travaux préliminaires démontrent l'intérêt de l'étude d'un tel milieu, donnant accès à des constituants glucidiques de tissus foetaux qui pour certains d'entre eux sont proches de ceux rencontrés dans les tissus tumoraux.

#### B - Fractionnement des oligosaccharide-alditols obtenus par $\beta$ -élimination du méconium

Nos premiers travaux ont consisté en l'isolement des oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline en milieu réducteur du méconium. La chromatographie en gel filtration de l'hydrolysate fournit deux fractions: une fraction lourde et une fraction incluse. Nous décrivons dans l'article qui suit les différentes méthodes de fractionnement des glycanne-alditols de la fraction incluse, par HPLC d'échange d'ions d'une part, de partage en phase normale puis en phase réverse d'autre part.

Article 2 :

C. CAPON, P. CACHE, Y. LEROY, G. STRECKER, J. MONTREUIL and B. FOURNET

Isolation of the major O-glycosidically linked oligosaccharides obtained by alkaline borohydride degradation of human meconium glycoproteins.

(1988) *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 425, 35-45

*Journal of Chromatography*, 425 (1988) 35-45

*Biomedical Applications*

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 3992

## ISOLATION OF THE MAJOR O-GLYCOSIDICALLY LINKED OLIGOSACCHARIDES OBTAINED BY ALKALINE BOROHYDRIDE DEGRADATION OF HUMAN MECONIUM GLYCOPROTEINS

CALLIOPE CAPON, PHILIPPE CACHE, YVES LEROY, GÉRARD STRECKER, JEAN MONTREUIL and BERNARD FOURNET\*

*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Associée au CNRS No. 217 and Laboratoire Pilote du M.E.N., Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex (France)*

(First received July 29th, 1987; revised manuscript received September 29th, 1987)

---

### SUMMARY

Neutral and acidic oligosaccharides derived from human meconium glycoproteins by alkaline borohydride degradation have been separated by high-performance liquid chromatography on a Micro-Pak anion-exchange column. In each class, oligosaccharides were purified by normal-phase (neutral and acidic oligosaccharides) and reversed-phase (neutral oligosaccharides) chromatography. Effective separations of neutral oligosaccharides and acidic oligosaccharides were achieved.

---

### INTRODUCTION

The intestinal glycoproteins of human meconium are characterized as high-molecular-mass compounds possessing many hundred covalently attached oligosaccharide units, which express a number of differentiation and oncofoetal carbohydrate antigens [1-4]. Studies carried out by Hounsell et al. [5] have established the structures of nine major mono- to tetrasaccharides, O-glycosidically linked, from human meconium glycoproteins and from group O-secretors. The meconium glycoproteins treated by pronase were fractionated into Ii antigen enriched and depleted fractions. The latter fraction was subjected to mild acid hydrolysis to enhance the expression of the oncofoetal antigens. The asialo- and afucoligosaccharides were obtained, after base-borohydride degradation, by high-performance liquid chromatography (HPLC) on octadecylsilyl and aminopropylsilyl columns.

This paper reports the separation of oligosaccharide-alditols obtained by alkaline borohydride treatment of human meconium by different HPLC tech-

niques: anion-exchange chromatography, partition chromatography on primary amine-bonded silica and reversed-phase chromatography.

## EXPERIMENTAL

### *Glycoproteins and oligosaccharides*

The new-born meconium was prepared as described previously [6]; 0.51 g of carbohydrate material was treated with 0.1 M potassium hydroxide–1 M potassium borohydride for 18 h at 45°C [7]. The resulting oligosaccharide-alditols were purified by gel permeation on a Bio-Gel P-6 (–400 mesh; Bio-Rad Labs., Richmond, CA, U.S.A.) column (85 cm × 2 cm I.D.) eluted with 0.5% acetic acid at a flow-rate of 18 ml/h. The oligosaccharides were detected at 206 nm (LKB 2138 Uvicord S, Bromma, Sweden).

### *Separation of oligosaccharide-alditols from Bio-Gel P-6 fraction of alkaline borohydride degradation of human meconium glycoproteins by HPLC on quaternary amine-bonded silica [8]*

HPLC was performed on a 10- $\mu$ m Micro-Pak AX-10 column (50 cm × 0.8 cm I.D.; Varian, Walnut Creek, CA, U.S.A.) with a Spectra-Physics Model 8700 liquid chromatograph (San Jose, CA, U.S.A.) equipped with an LDC variable-wavelength detector (Spectro Monitor D, Milton Roy, Riviera Beach, FL, U.S.A.) connected to a Spectra-Physics Model 4100 computing integrator.

For preparative chromatography, 48 mg of the Bio-Gel P-6 fraction (FII) were subjected to HPLC according to Paz-Parente et al. [9].

Each fraction, except the neutral oligosaccharide-alditols FII-N eluted with water, was purified by gel permeation on a Bio-Gel P-2 (200–400 mesh; Bio-Rad Labs.) column (92 cm × 2 cm I.D.) eluted with 0.5% acetic acid at a flow-rate of 15 ml/h. The fractions were revealed with orcinol–sulphuric acid reagent [10] on silica gel plates (pre-coated silica gel 60; Merck, Darmstadt, F.R.G.).

### *HPLC separation of neutral oligosaccharide-alditols on primary amine-bonded silica*

HPLC was performed on a 5- $\mu$ m Amino Zorbax column (25 cm × 0.94 cm I.D.; Du Pont de Nemours, Wilmington, DE, U.S.A.). A 11.5-mg amount of oligosaccharide-alditols FII-N dissolved in 100  $\mu$ l of water was injected. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile–water, 70:30, v/v). After the injection, isocratic conditions were applied for 10 min with the initial solvent, followed by a linear gradient to acetonitrile–water (60:40, v/v) for 60 min and then isocratic conditions for 20 min. The flow-rate was 3 ml/min. The oligosaccharides were detected at 200 nm.

### *HPLC separation of oligosaccharide-alditols from primary amine-bonded silica HPLC fractions on an octadecylsilyl-bonded column*

HPLC was performed on a 5- $\mu$ m ODS Zorbax column (25 cm × 0.94 cm I.D.; Du Pont Instruments). Each fraction from primary amine-bonded silica HPLC was refractionated by reversed-phase chromatography. The column was equilibrated with distilled water. After injection, isocratic conditions were applied for

15 min with the initial solvent (water), followed by a linear gradient to water-acetonitrile (90:10, v/v) for 120 min. The flow-rate was 3 ml/min. The oligosaccharide-alditols were detected at 200 nm. The chart speed of the integrator was 0.5 cm/min.

*HPLC separation of acidic oligosaccharide-alditols FII-1 and FII-2 on primary amine-bonded silica [11]*

HPLC was performed on a 5- $\mu$ m Amino Zorbax column (25 cm  $\times$  0.94 cm I.D.; Du Pont Instruments). The oligosaccharide-alditols FII-1 fraction (7.7 mg) dissolved in water (80  $\mu$ l) was injected into the column. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile-15 mM potassium dihydrogenphosphate adjusted to pH 5.2; 75:25, v/v). After the injection, isocratic conditions were applied with the initial solvent for 25 min, followed by a linear gradient to acetonitrile-15 mM potassium dihydrogenphosphate (35:65, v/v) for 60 min and then isocratic conditions for 30 min. The flow-rate was 3 ml/min. The oligosaccharide-alditols were detected at 200 nm.

All the collected fractions were purified by gel permeation on a Fractogel TSK HW-40 column (25-40  $\mu$ m, 36 cm  $\times$  1.6 cm I.D.; Merck) with a Shimadzu LC-5A liquid chromatograph equipped with an LKB Uvicord S 2138 detector and an SP 6040 differential refractometer. Elution was carried out with 0.5% acetic acid at a flow-rate of 1 ml/min.

*Molar composition of oligosaccharide-alditols*

The molar composition of oligosaccharide-alditols was determined by gas chromatography (GC) after methanolysis (0.5 M hydrochloric acid-methanol for 24 h at 80°C), N-reacetylation and trimethylsilylation according to Kamerling et al. [12] modified by Montreuil et al. [13].

## RESULTS AND DISCUSSION

The separation of a mixture of oligosaccharide-alditols obtained by alkaline borohydride treatment of 510 mg of human meconium glycoproteins on a Bio-Gel P-6 column is shown in Fig. 1. The purification of the  $\beta$ -elimination products gives two fractions: 100 mg of FI and 87 mg of FII. The yield with respect to the starting material was 36%. The carbohydrate composition of these fractions was determined by GC (Table I). The fraction FI, corresponding to the high-molecular-mass oligosaccharides, is characterized by a small amount of N-acetylgalactosaminitol and the presence of mannose. The fraction FII possesses a molar carbohydrate composition in accordance with the structure of O-glycosidically linked oligosaccharides: a high content of N-acetylgalactosaminitol and a small amount of mannose residues.

HPLC on quaternary amine packings of the fraction FII obtained by Bio-Gel P-6 chromatography of the alkaline borohydride treatment of human meconium results in two major fractions, the neutral fraction FII-N and the acidic fraction FII-1 (Fig. 2). The results of the preparative chromatography of 48 mg of FII and the carbohydrate compositions of the fractions are given in Table II. The use of

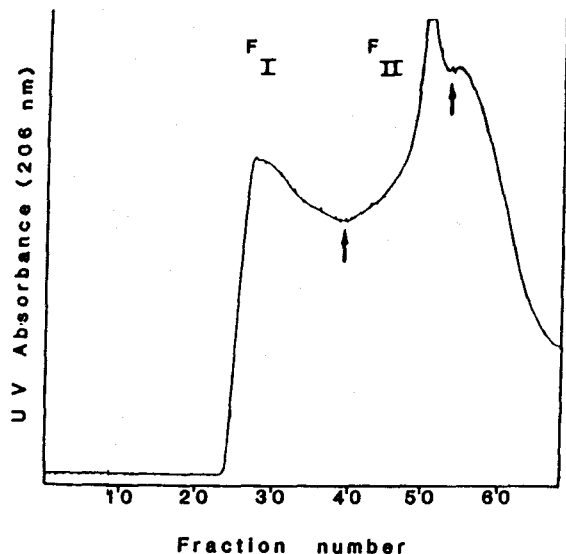


Fig. 1. Gel permeation of oligosaccharide-alditols obtained from human meconium glycoproteins by alkaline borohydride treatment on a Bio-Gel P-6.

TABLE I

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND MASSES OF FRACTIONS OBTAINED BY BIO-GEL P-6 CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES RELEASED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM

Fraction	Molar ratio*							Mass (mg)
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol	
FI	0.48	1	0.2	0.3	1.1	0.3	0.09	100
FII	0.48	1	0.12	0.15	1	0.23	0.46	87

\*The molar ratio of Gal was taken as 1; Fuc = fucose; GlcNAc = N-acetylglucosamine; NeuAc = N-acetylneuraminic acid; GalNAc-ol = N-acetylgalactosaminitol.

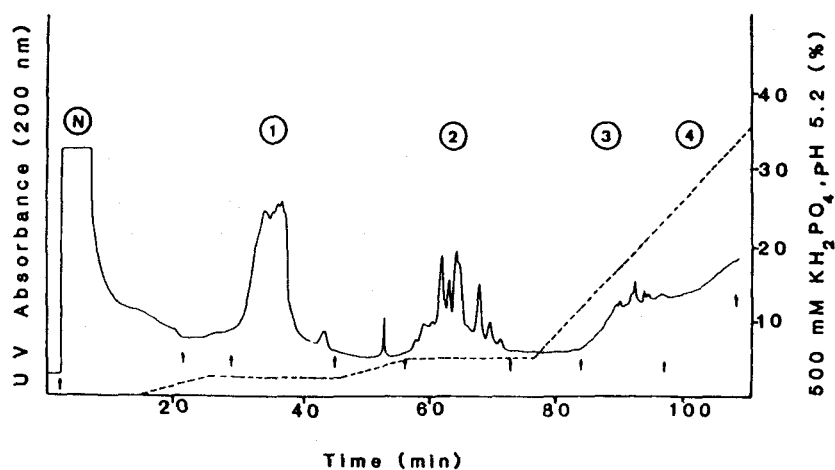


Fig. 2. Analysis of oligosaccharide-alditols obtained from  $\beta$ -elimination of human meconium (Bio-Gel P-6, FII fraction) on a 10- $\mu$ m AX-10 column.



TABLE II

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND MASSES OF FRACTIONS OBTAINED BY AX-10 PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS RELEASED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM (FII)

Fraction	Molar ratio*							Mass (mg)
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol	
FII	0.48	1	0.12	0.15	1	0.23	0.46	48
FII-N	0.61	1	0.13	0.16	0.71	—	0.44	11.5
FII-1	0.53	1	0.12	0.14	1.08	0.38	0.44	7.7
FII-2	0.47	1	0.17	0.09	0.89	0.58	0.39	2.5
FII-3	0.45	1	0.18	0.08	0.82	0.38	0.15	0.5
FII-4	0.44	1	0.37	0.18	0.90	0.15	0.03	0.27

\*The molar ratio of Gal was taken as 1.

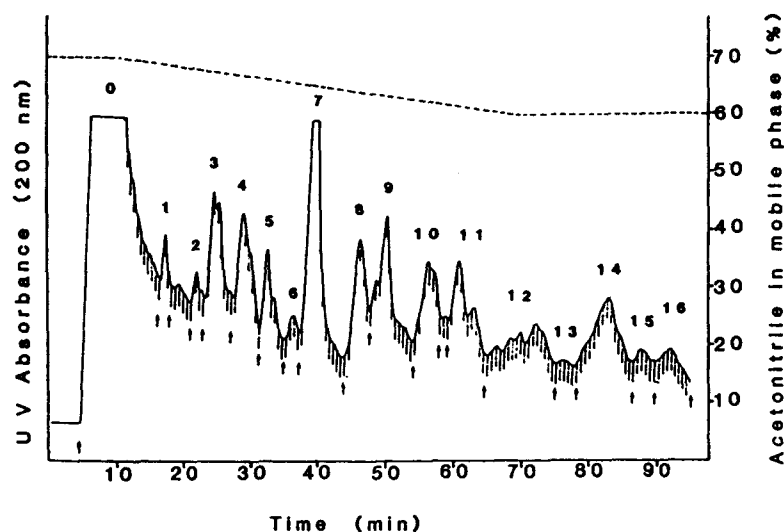


Fig. 3. Analysis of neutral oligosaccharide-alditols (FII-N) obtained from  $\beta$ -elimination of human meconium and anion-exchange chromatography on an Amino Zorbax column.

a column filled with silica modified by an organic quaternary amine provides a recovery of 47.5% for the oligosaccharide-alditols. The major fraction consists of neutral oligosaccharide-alditols (50%). Fractions FII-1 and FII-2 have the same chromatographic mobility as monosialylated oligosaccharides and disialylated oligosaccharides [9], and represent 34.3 and 11% of total oligosaccharide-alditols, respectively.

The neutral fraction (FII-N) from the AX-10 chromatography of oligosaccharide-alditols FII was subjected to HPLC using acetonitrile–water and alkylamine-modified silica. The effective separation of sixteen fractions was obtained in 80 min (Fig. 3). The carbohydrate composition and the mass of each fraction are given in Table III. The yield with respect to starting material (11.5 mg) was 48.6%.

In order to purify the oligosaccharide-alditol fractions obtained by HPLC on an alkylamine column, the fractions FII-N-3, -4, -5, -7, -8, -9, -10, -11 and -12 were subjected to HPLC on an octadecylsilyl column with water and water–acetonitrile as solvent. The results of the chromatographic separation of

TABLE III

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND MASSES OF FRACTIONS OBTAINED BY SEMI-  
PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF NEUTRAL OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS (FII-  
N) RELEASED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM

Fraction	Molar ratio*						Mass ( $\mu\text{g}$ )
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	GalNAc-ol	
FII-N-0	2.38	5.2	0.7	2.68	5.6	1	84
-1	0.56	0.91	0.28	0.42	2.6	1	84
-2	1.12	1.49	0.3	0.28	1	1	62
-3	0.19	1.06	0.09	—	0.94	1	335
-4	0.65	1.08	0.1	—	1.0	1	300
-5	2	2	0.16	—	2.2	1	325
-6	1.67	2	0.2	0.24	2	1	58
-7	0.36	1.51	0.05	0.13	1.1	1	1000
-8	1.3	2	—	—	1.7	1	187
-9	1.37	2.3	—	—	1.8	1	170
-10	1.7	1.9	—	—	1.8	1	410
-11	1	2.6	—	0.64	2.3	1	160
-12	2	3.3	—	0.58	3.0	1	610
-13	1.8	2.8	0.35	0.51	2.3	1	185
-14	1.9	3.0	0.23	0.36	3.17	1	760
-15	1.5	2.3	0.8	0.3	1.95	1	240
-16	1.55	2.5	0.36	0.28	3.0	1	480
Tail	2	3.6	0.5	—	3.7	1	145
Recovery							5592

\*The molar ratio of GalNAc-ol was taken as 1.

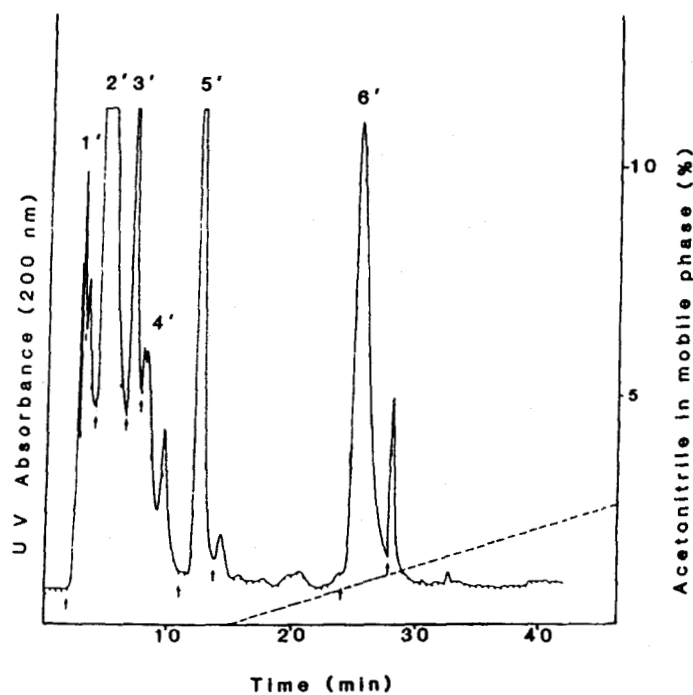


Fig. 4. Analysis of neutral oligosaccharide-alditols FII-N-7 obtained from  $\beta$ -elimination of human meconium, anion-exchange chromatography and normal-phase partition chromatography, by reversed-phase chromatography on a Zorbax ODS column.

TABLE IV

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS OF FRACTIONS OBTAINED BY SEMI-PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY ON OCTADECYLSILYL COLUMN OF NEUTRAL OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS FROM ALKYLAMINE-MODIFIED SILICA CHROMATOGRAPHY

Fraction	Molar ratio*					
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	GalNAc-ol
FII-N-3-1'	0.5	1	—	0.5	1	—
-2'	0.84	2.5	—	—	2.5	1
-3'	—	1	—	—	1	1
FII-N-4-2'	—	0.96	—	—	0.90	1
-3'	0.88	0.92	—	0.83	0.3	1
-4'	3.4	4.2	0.6	1.6	4.2	1
-5'	—	1	—	—	1.8	—
-6'	0.56	1	—	—	1.7	—
-7'	1.1	1.2	0.1	—	1	1
-8'	0.8	0.8	—	—	0.8	1
FII-N-5-2'	1	0.94	—	—	0.97	1
-3'	0.99	1.0	—	—	0.83	1
-4'	1	2.1	0.42	—	3.7	1
-5'	1.3	1.5	—	—	1.8	1
FII-N-7-1'	1	1.5	—	—	1	—
-2'	—	2	—	—	1	1
-3'	1.75	1.45	—	—	1.45	1
-4'	1.57	1.9	0.3	0.62	3.2	1
-5'	1.3	1	—	1.45	1.56	1
-6'	1	1.7	—	—	1	1
FII-N-8-2'	1.8	2	—	—	2.1	1
-3'	0.9	1.75	—	—	1.37	1
-4'	4	4.3	—	—	6.5	1
-5'	—	4.7	—	1	5.9	1
FII-N-9-1'	2.7	3.4	3	2.7	1.5	—
-2'	0.8	1.54	—	—	0.93	1
-3'	0.3	1.7	—	—	1.2	1
-4'	0.9	1.7	0.17	0.42	1.3	1
-5'	1.05	2.1	—	0.64	2.1	1
-6'	1.46	1.6	—	—	0.87	1
-7'	0.99	1.5	—	—	0.99	1
-8'	1.6	1.8	—	—	1.27	1
FII-N-10-1'	1.25	1.6	0.25	0.25	1	1
-2'	1.4	2	—	—	1.87	1
-3'	0.72	2.1	—	—	2.9	1
-4'	1.8	3.3	—	0.9	2.8	1
-5'	1	1.7	—	—	1.7	1
-6'	1.9	2.7	—	—	2	1
-7'	1.6	1.1	—	0.2	0.9	1
FII-N-11-3'	0.75	1	—	0.5	1	1
FII-N-12-2'	1.5	2.47	0.26	0.2	2.1	1
-3'	1.6	3.3	—	0.29	4	1
-4'	2.3	3.6	—	—	0.44	1
-5'	3.1	3	—	1.9	2.9	1
-6'	0.9	0.93	—	0.28	1.48	1
-7'	1.73	2.7	0.36	—	2.23	1

\*The molar ratio of GalNAc-ol was taken as 1.

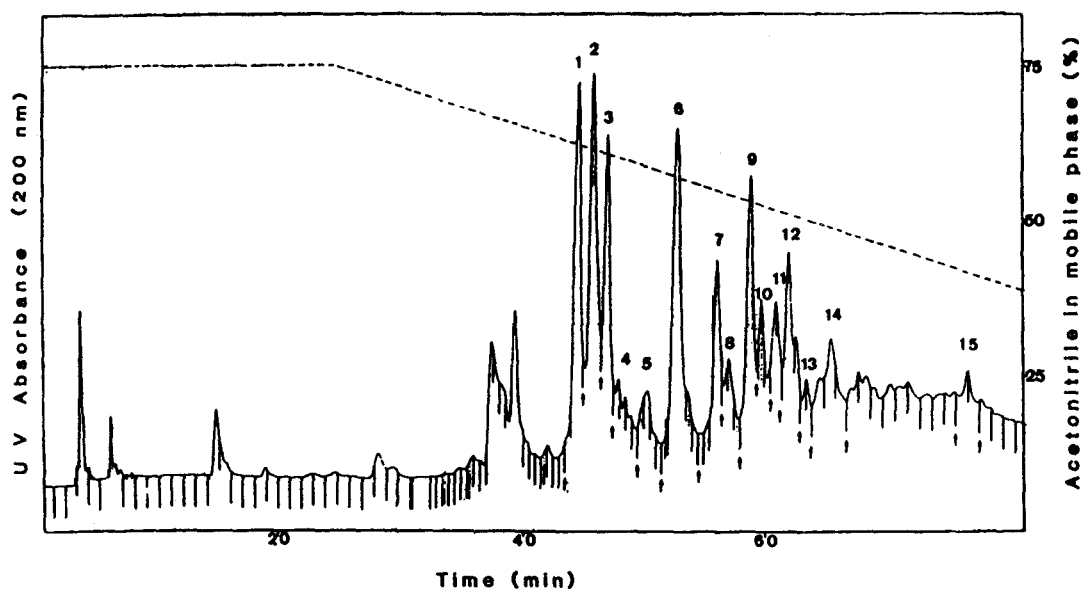


Fig. 5. Analysis of acidic oligosaccharide-alditols (FII-1) obtained from  $\beta$ -elimination of human meconium and anion-exchange chromatography on an Amino Zorbax column.

TABLE V

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND MASSES OF FRACTIONS RELEASED BY SEMI-REPREPARATIVE CHROMATOGRAPHY ON ALKYLAMINE-MODIFIED SILICA OF ACIDIC OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS (FII-1) OBTAINED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM

Fraction	Molar ratio*							Mass ( $\mu$ g)
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol	
FII-1-1	—	—	—	1	—	1	1	300
-2	—	0.2	—	0.1	0.63	1	1	400
-3	—	0.76	—	—	0.23	1.08	1	290
-4	0.32	1	—	—	0.6	1.09	1	110
-5	0.49	1.3	—	0.39	1.23	0.73	1	120
-6	0.14	0.7	—	—	0.67	0.81	1	525
-7	—	1.88	—	—	1.0	1	1	180
-8	0.49	2	—	—	1.46	0.82	1	120
-9	0.83	1	—	—	1	1	1	330
-10	1	1.28	0.33	—	1	0.8	1	156
-11	0.8	2.4	0.3	0.15	1.2	1	1	240
-12	3.5	3.2	—	0.74	2.3	1.48	1	123
-13	2	2.84	—	0.7	2.7	1.49	1	100
-14	2.8	4.7	—	—	2.3	—	1	82
-15	2.34	4.85	1.8	—	3.8	1.2	1	110

\*The molar ratio of GalNAc-ol was taken as 1.

the major fraction FII-N-7 are illustrated in Fig. 4, and Table IV gives the carbohydrate composition of each fraction. The use of a reversed-phase column provides good purification of each oligosaccharide-alditol fraction obtained by HPLC on an alkylamine column. For instance, the peak FII-N-7 (Fig. 3), which appears to be relatively pure from the alkylamine chromatography, gave six fractions (FII-

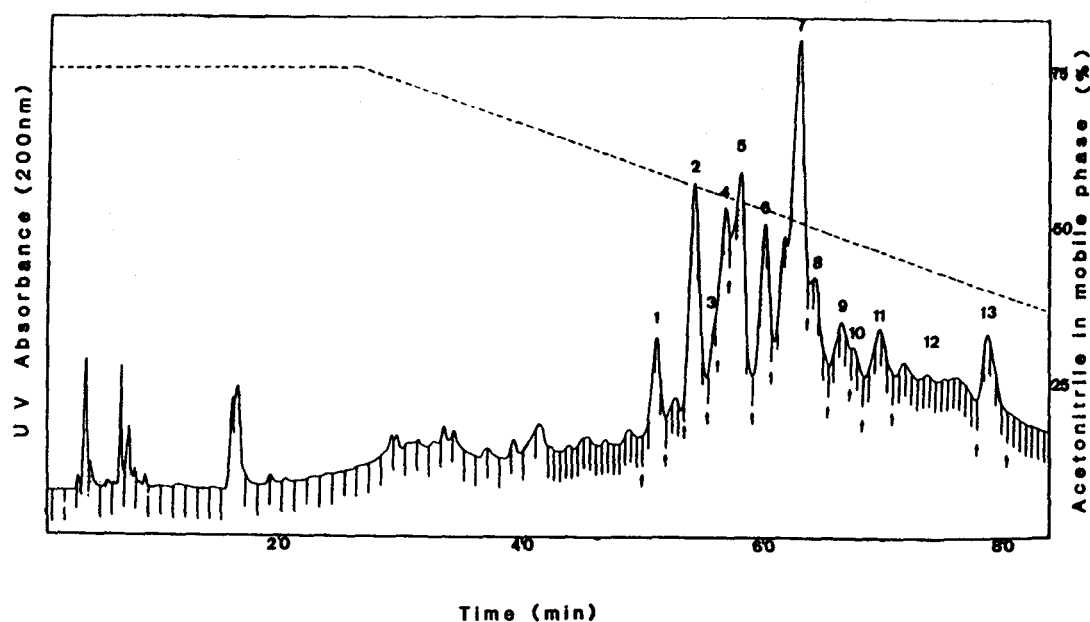


Fig. 6. Analysis of acidic oligosaccharide-alditols (FII-2) obtained from  $\beta$ -elimination of human meconium and anion-exchange chromatography on an Amino Zorbax column.

TABLE VI

CARBOHYDRATE COMPOSITIONS AND MASSES OF FRACTIONS RELEASED BY SEMI-REPREPARATIVE CHROMATOGRAPHY ON ALKYLAMINE-MODIFIED SILICA OF ACIDIC OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS (FII-2) OBTAINED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM

Fraction	Molar ratio*							Mass ( $\mu$ g)
	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol	
FII-2-1	0.8	1.2	—	—	1	1.3	1	85
-2	0.2	1.2	—	—	—	2.2	1	110
-3	—	1.4	—	—	1.1	1.6	1	27
-4	—	1.2	—	—	0.95	2.1	1	90
-5	—	1.6	—	0.73	1	2	1	150
-6	—	1.6	—	0.8	1.2	2.2	1	145
-7	0.53	1	—	—	0.85	1.82	1	500
-8	0.58	1.7	—	1.4	1.2	1.7	1	155
-9	0.7	1.9	—	0.7	1.6	1.43	1	130
-10	0.8	2.1	—	—	2.1	1.3	1	50
-11	1.1	2.2	—	—	1.95	0.7	1	60
-12	1.5	2.7	0.47	—	2.8	1.1	1	175
-13	0.9	2.6	1.8	—	2.9	2	0.4	140

\*The molar ratio of GalNAc-ol was taken as 1.

N-7-1' to -6', Fig. 4) on reversed-phase chromatography. Oligosaccharide-alditols FII-N-3-3', FII-N-4-2',8', FII-N-5-2',3', FII-N-7-2',6', FII-N-8-2', FII-N-10-3' and FII-N-12-5' were found to be homogeneous on the basis of HPLC and of the monosaccharide molar compositions.

In the neutral fraction, the oligosaccharide FII-N-3-3' with galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylgalactosaminitol (GalNAc-ol) in

a molar ratio of 1:1:1 and the oligosaccharide FII-N-7-2' with Gal, GlcNAc and GalNAc-ol in a molar ratio of 2:1:1 possess the same carbohydrate composition of oligosaccharide fractions O4 and N1, respectively, isolated by Hounsell et al. [5] from meconium glycoproteins obtained from group O-secretors.

Other neutral oligosaccharides with the same core structure were isolated by Hounsell et al. [5] but with an additional monosaccharide. It is the case for the oligosaccharide FII-N-7-6', which has the same carbohydrate composition as both oligosaccharide FII-N-7-2' and N1 (Hounsell et al. [5]), plus an additional fucose residue.

The acidic fraction FII-1 from AX-10 chromatography of oligosaccharide-alditols FII was subjected to HPLC using acetonitrile-15 mM potassium dihydrogenphosphate as solvent and alkylamine-modified silica. The effective separation of fifteen fractions was obtained in 90 min (Fig. 5). The carbohydrate composition and mass of each fraction are given in Table V. Seven major fractions were obtained (FII-1-1, -2, -3, -6, -7, -9 and -11). The yield was 41.4%. Based on HPLC behaviour and carbohydrate compositions, fractions FII-1-1, -2, -3, -6, -7 and -9 appear to be in a pure state. These oligosaccharides also possess the same core composition as oligosaccharide fractions isolated from mild acid hydrolysis of meconium glycopeptides by Hounsell et al. [5] with additional sialic acid and fucose residues. The presence of Man and GalNAc-ol indicates that fraction FII-1-15 is a mixture of N- and O-glycosidically linked oligosaccharides.

The acidic fraction FII-2 from AX-10 chromatography was analysed by HPLC on an alkylamine-modified silica, under the same conditions as for the acidic fraction FII-1. Thirteen fractions were obtained (Fig. 6). The molar carbohydrate composition and the mass of each fraction are given in Table VI. The yield with respect to the starting material (2.5 mg) was 65.6%. This fraction FII-2 shows that these oligosaccharides possess the same chromatographic mobilities as disialyloligosaccharides.

However, several oligosaccharides do not contain 2 mol of sialic acid; this is the case for oligosaccharides FII-2-1, -3, -8, -10, -11 and -12.

The presence of sulphate residues cannot be excluded. The carbohydrate composition of fraction FII-2-13 shows the presence of Man. Like fraction FII-1-15, this fraction is a mixture of N- and O-glycosidically linked oligosaccharides.

The combination of ion-exchange, normal-phase and reversed-phase chromatography allows one to prepare oligosaccharide-alditols from human meconium in good yields. These oligosaccharide-alditols are, at present, being studied for the primary structure determination. The antigenic activities of these oligosaccharides will also be studied. For instance, the oligosaccharide fractions FII-N-10-3', FII-1-6 and FII-1-9 contain a carbohydrate composition consistent with the glycan moiety of the antigenic determinant X found in human ovarian cyst glycoproteins [14].

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.A. No. 217), the Université des Sciences et Techniques de Lille I and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contract CRE 845010).

## REFERENCES

- 1 H.C. Gooi, T. Feizi, A. Kapadia, B.B. Knowles, D. Solter and M.J. Evans, *Nature*, 292 (1981) 156.
- 2 H.C. Gooi and T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106 (1982) 539.
- 3 H.C. Gooi, K. Uemura, P.A.W. Edwards, C.S. Foster, N.J. Pickering and T. Feizi, *Carbohydr. Res.*, 120 (1983) 293.
- 4 T. Feizi and R.A. Childs, *Trends Biochem. Sci.*, 10 (1985) 24.
- 5 E.F. Hounsell, A.M. Lawson, J. Feeney, H.C. Gooi, N.J. Pickering, M.S. Stoll, S.C. Lui and T. Feizi, *Eur. J. Biochem.*, 148 (1985) 367.
- 6 M.C. Herlant-Peers, J. Montreuil, G. Strecker, L. Dorland, H. van Halbeck, G.A. Veldink and J.F.G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.*, 177 (1981) 291.
- 7 D. Aminoff, W.D. Gathmann, C.M. Mc Lean and T. Yadoma, *Anal. Biochem.*, 101 (1980) 44.
- 8 J.U. Baenziger and N. Natowicz, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 357.
- 9 J. Paz-Parente, Y. Leroy, J. Montreuil and B. Fournet, *J. Chromatogr.*, 288 (1984) 147.
- 10 R. Humbel and M. Collaert, *Clin. Chim. Acta*, 60 (1975) 143.
- 11 M.L.E. Bergh, P. Kopper and D.H. Van den Eijnden, *Carbohydr. Res.*, 94 (1981) 225.
- 12 J.P. Kamerling, G.J. Gerwig, J.F.G. Vliegthart and J.R. Clamp, *Biochem. J.*, 151 (1975) 491.
- 13 J. Montreuil, S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik and G. Strecker, in M.F. Chaplin and J.F. Kennedy, (Editors), *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1986, p. 143.
- 14 K.O. Lloyd, E.A. Kabat and E. Licerio, *Biochemistry*, 7 (1968) 2976.

**C - Structure primaire des oligosaccharide-alditols majeurs obtenus par  $\beta$ -élimination du méconium**

A l'aide des techniques d'HPLC décrites dans le paragraphe précédent, nous avons pu isoler de l'hydrolyse alcaline du méconium, une cinquantaine d'oligosaccharides neutres et une trentaine d'oligosaccharides sialylés. Nous avons déterminé la structure primaire de 19 oligosaccharide-alditols majeurs à l'aide de la perméthylation, de la spectrométrie de masse utilisant un mode d'ionisation par atomes neutres accélérés (FAB-MS : Fast atom bombardment-Mass Spectrometry) et de la résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz.

Article 3

C. CAPON, Y. LEROY, J-M. WIERUSZESKI, G. RICART, G. STRECKER, J. MONTREUIL  
and B. FOURNET

Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins.

soumis à publication à *Eur. J. Biochem.*



**STRUCTURES OF O-GLYCOSIDICALLY LINKED OLIGOSACCHARIDES  
ISOLATED FROM HUMAN MECONIUM GLYCOPROTEINS.**

Calliope Capon<sup>\*</sup>, Yves Leroy<sup>\*</sup>, Jean-Michel Wieruszkeski<sup>\*</sup>, Guy Ricart<sup>\*\*</sup>,  
Gérard Strecker<sup>\*</sup>, Jean Montreuil<sup>\*</sup> and Bernard Fournet<sup>\*#</sup>.

<sup>\*</sup>From the Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n 217 and Laboratoire Pilote du M.E.N.), 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

<sup>\*\*</sup>From the Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

#Correspondence to B.Fournet, Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Presented in part at the IXth International Symposium on Glycoconjugates, July 6-11, 1987, Lille, France.

The abbreviations used are : HPLC, high performance liquid chromatography; GLC, gas-liquid chromatography; GLC-MS, gas-liquid chromatography combined with mass spectrometry; FAB-MS, fast atom bombardment-mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; NeuAc, N-acetylneuraminic acid; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GalNAc-ol, N-acetylgalactosaminitol.

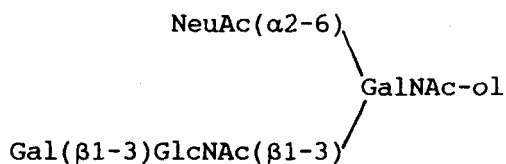
The structure of the major O-glycosidically linked neutral and acidic oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins were established. Neutral and acidic oligosaccharides were released by alkaline borohydride treatment, purified by Biogel P-6 and fractionated by high performance liquid chromatography.

This approach resulted in 50 neutral and 30 acidic oligosaccharides. The present study reports the primary structural analysis of five neutral oligosaccharides, ten monosialylated oligosaccharides, one monosialylated monosulfated oligosaccharide and three disialylated oligosaccharides, by permethylation, FAB-MS analysis and 400-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy.

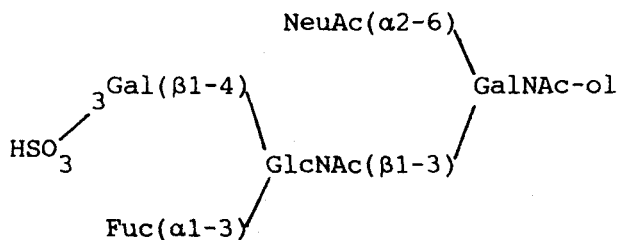
The following structures are not been described previously :

F II-1-6 :

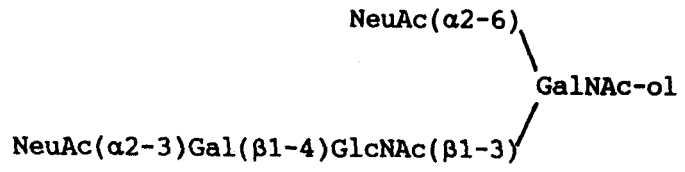
B



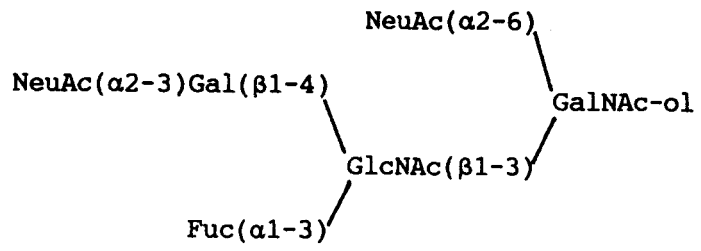
F II-2-1 :



F II-2-4 :



F II-2-7 :



The intestinal glycoproteins of human meconium are characterized as high molecular weight compounds with numerous carbohydrate chains of the "mucin type". These mucins are a rich source of carbohydrate structures which express multiple blood group activities and occur as membrane-associated antigens, recognized by hybridoma antibodies (1-4). A previous study (5) described the structure of fifteen free oligosaccharides derived from catabolism of O- and N-glycans accumulating in new born meconium. In the same group (6) the research has been extended to glycoasparagines with the description of thirteen of them by high resolution  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy analysis. From O-glycosidically linked glycoproteins, further studies (7) established the structures of nine major mono- to tetrasaccharides obtained after mild acid hydrolysis and base-borohydride degradation from meconium samples of group O secretors. These oligosaccharides were derived from meconium glycopeptides which had been depleted of I and i antigen activities.

Recently (8), neutral and acidic oligosaccharide-alditols obtained by alkaline borohydride degradation of human meconium glycoproteins have been separated by HPLC on an anion-exchange column. The neutral fraction was purified by normal-phase and further reversed-phase chromatographies while acidic fractions were fractionated only by normal-phase chromatography.

Thus, we have isolated several low molecular weight oligosaccharides of different size and composition and also isomers which vary in linkage position or anomeric configuration. Using methylation analysis,  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and FAB-MS, we propose the primary structure for 19 major oligosaccharides.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Preparation of new-born meconium glycoproteins.

The new-born meconium glycoproteins were prepared as previously described (5)

### Release of oligosaccharide chains from meconium glycoproteins with alkaline borohydride.

Oligosaccharide chains were released from 510 mg of new-born meconium by 20 ml of 0.1M KOH containing 1M  $\text{KBH}_4$  for 18h at 45°C (9). The  $\beta$ -elimination reaction was stopped by addition of Dowex 50w-x8 ( $\text{H}^+$ ) until pH 5. After filtration, the filtrate was concentrated to dryness and boric acid was removed by repeated evaporation with methanol.

### Gel filtration chromatography.

Gel filtration chromatography was performed on a column (2x85 cm) of Bio-Gel P-6 (-400 mesh; Bio-Rad Labs.) equilibrated with 0.5% acetic acid. Chromatography was at room temperature with a flow rate of 18 ml/h. The oligosaccharides were detected at 206 nm (LKB 2138 Uvicord S).

### HPLC separations.

HPLC of oligosaccharide-alditols on quaternary amine packing, alkylamine and C-18 modified silica columns were previously reported (8).

### Molar composition of oligosaccharide-alditols.

The molar carbohydrate composition was determined by gas-liquid chromatography (GLC) after methanolysis (0.5M HCl/MeOH, 24h, 80°C),

N-reacetylation and trimethylsilylation according to (10) modified by (11).

Methylation analysis.

The oligosaccharide-alditols (10-50 µg) were methylated according to Ciucanu and Kerek (12) with methyl iodide, solid base (NaOH) and methylsulfoxide. The partially methylated and acetylated methyl glycosides were identified by GLC-MS according to (13).

Fast atom bombardment-mass spectrometry of native oligosaccharide-alditols.

A Kratos MS 50 RF high resolution mass spectrometer (Kratos Analytical Instrument, Urmstom, Manchester, UK.) equipped with a DS 90 (DGDG/30) data system was used in these studies. The mass spectrometer was operated at a 8-KeV accelerating potential. An Ion Tech Model B 11 NF saddle field fast atom source energized with the B 50 current regulated power supply was used with Xenon employed as the bombarding atom (operating conditions: 7.3 KV, 1.2 mA). The mass range 2000 to 200 was scanned at 10s/decade.

The native oligosaccharide-alditols (1-5 µg) were dissolved in 1 µl of distilled water and loaded on the copper tip with glycerol as matrix. The source housing was not heated (14).

NMR analysis.

Solutions of oligosaccharide-alditols were exchanged several times in D<sub>2</sub>O with intermediate lyophilisations. NMR spectral analysis of the compounds (10-400 µg) in D<sub>2</sub>O (99.95 atom % D, CEA France) was carried out on a Bruker AM-400 WB spectrometer operating in the Fourier-transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts are given relative to sodium 4,4 dimethyl-4-silapentane-1 sulfonate

(indirectly to acetone in  $D_2O$   $\delta = 2.225$  ppm) (15). Resolution enhancement of  $^1H$ -NMR spectra was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation.

## RESULTS

### Isolation of oligosaccharide-alditols

The purification by gel filtration chromatography on a Bio-Gel P-6 column of products obtained after alkaline borohydride degradation of new-born meconium as described in detail in our earlier report (8) gives two fractions FI and FII.

The lower molecular weight oligosaccharide-alditols in fraction FII possess a molar carbohydrate composition in accordance with the structure of O-glycosidically linked oligosaccharides. This fraction contains about 50% neutral oligosaccharide-alditols (FII-N). The acidic fractions FII-1 to -4 possess the same chromatographic behaviour as mono- to tetrasialylated oligosaccharides (16) and represent 34.3%, 11%, 2.2%, 1.1% of total oligosaccharide-alditols respectively (8).

The neutral fraction (FII-N) was subjected to HPLC on an alkylamine-modified silica column and sixteen fractions were obtained. The major ones ( FII-N-3, -4, -5, -7, -8, -9, -10, -11 and -12) were rechromatographed on an octadecylsilyl column. The acidic fractions FII-1 and FII-2 were fractionated on alkylamine modified silica column, fifteen fractions were obtained in the case of fraction FII-1 and thirteen fractions for FII-2 (8). In these conditions we isolated five neutral, ten monosialylated, one monosialylated monosulfated and three disialylated fractions.



Structure determination.

Fraction FII-N-3-3'. - The molar carbohydrate composition (Table 1) and the result of negative FAB-MS of native oligosaccharide with the ion at  $m/z$  587  $(M-H)^-$  allow to conclude at the presence of a trisaccharide in the fraction II-N-3-3'. Methylation analysis (Table 2) gives two di-O-methylglucosamine derivatives : 3,6-di-O-methyl and 4,6-di-O-methyl glucosamines, showing the heterogeneity of this fraction with the presence of two trisaccharides : Gal(1-4)GlcNAc(1-3)GalNAc-ol and Gal(1-3)GlcNAc(1-3)GalNAc-ol.

400-MHz  $^1H$ -NMR spectroscopy analysis confirms the presence of two trisaccharide-alditol isomers in this fraction. The chemical shift of H-2 of GalNAc-ol ( $\delta=4.287$ ) demonstrates the sequence GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol. The identification of two separate anomeric protons for the N-acetylglucosamine residues ( $\delta=4.630$  and  $\delta=4.652$  respectively) and for the galactose residues ( $\delta=4.454$  and  $\delta=4.459$  respectively) allowed us to conclude that the one galactose residue is conjugated to GlcNAc with a ( $\beta$ 1-4) linkage and one galactose residue is conjugated to GlcNAc with a ( $\beta$ 1-3) linkage. The other parameters (see Table 3) are in accordance with data described previously (17)

On the basis of these observations, the following structures are assigned to oligosaccharide fraction FII-N-3-3' :

A: Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol

B: Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol.

Fraction II-N-7-2'. - Carbohydrate, methylation analysis and FAB-MS in negative mode with a major peak at  $m/z$  749  $(M-H)^-$  indicate the tetrasaccharidic nature of this oligosaccharide (Fig.1). Methylation

**TABLE 1**

**CARBOHYDRATE COMPOSITIONS OF NEUTRAL, MONOSIALYLATED, DISIALYLATED AND MONOSIALYLATED MONOSULFATED FRACTIONS OBTAINED BY ALKALINE BOROHYDRIDE TREATMENT OF HUMAN MECONIUM AND HPLC.**

Fractions	Molar ratio*					
	Fuc	Gal	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol
FII-N-3-3'	-	1.0	-	1.0	-	1
FII-N-7-2'	-	2.0	-	1.0	-	1
FII-N-7-6'	1.0	1.7	-	1.0	-	1
FII-N-10-3'	0.4	2.1	-	2.9	-	1
FII-1-1	-	-	1.0	-	1.0	1
FII-1-2	0.2	-	0.1	0.6	1.0	1
FII-1-3	-	0.8	-	0.2	1.1	1
FII-1-6	0.1	0.7	-	0.7	0.8	1
FII-1-7	0.2	1.8	-	1.0	1.0	1
FII-1-9	0.8	1.0	-	1.0	1.0	1
FII-2-1	0.8	1.2	-	1	1.3	1
FII-2-2	0.2	1.2	-	-	2.2	1
FII-2-4	-	1.2	-	0.9	2.1	1
FII-2-7	0.5	1.0	0.1	0.8	1.8	1

\*The molar ratio of GalNAc-ol was taken as 1.

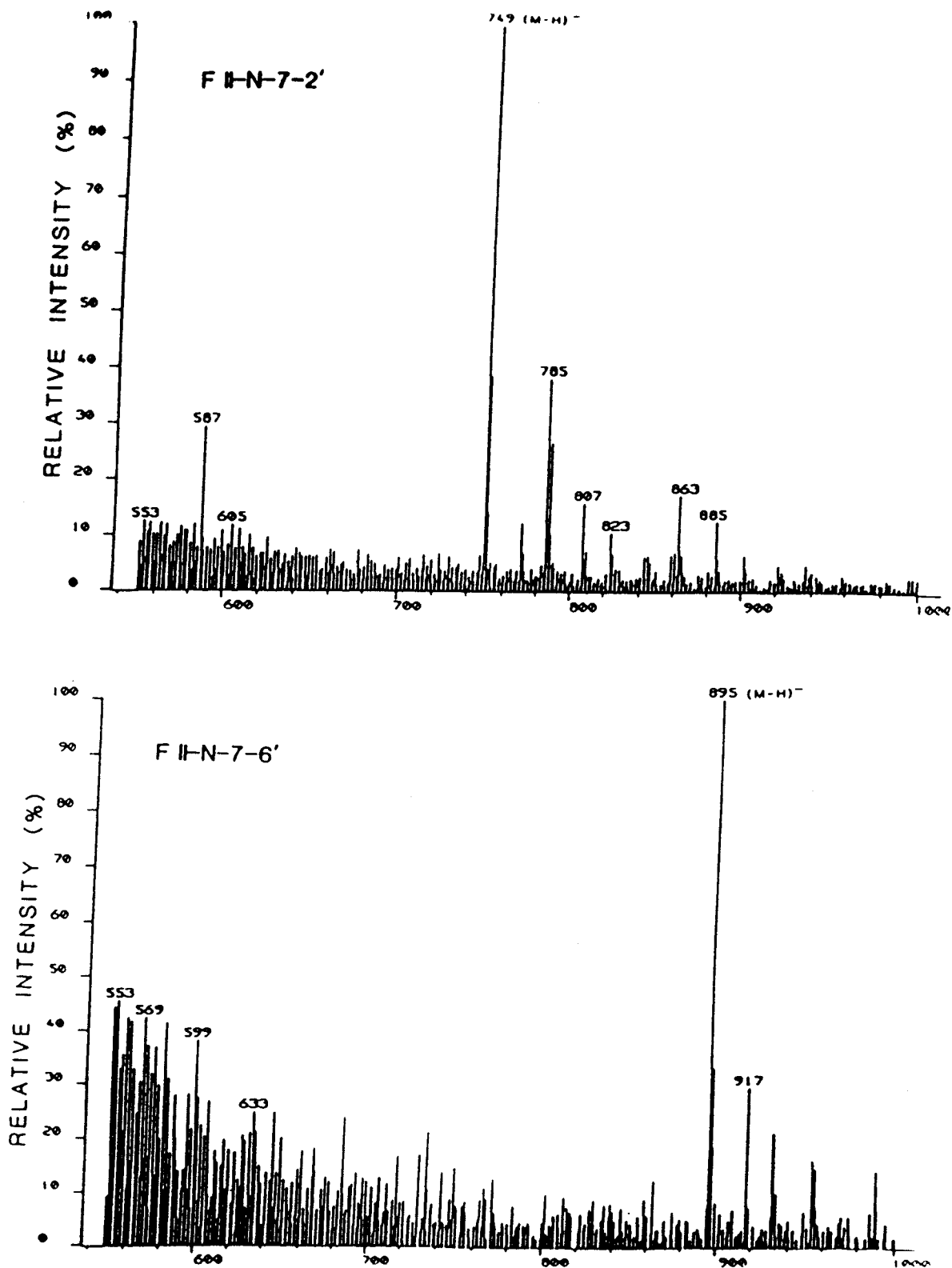
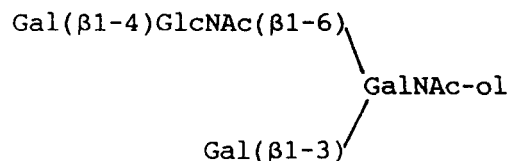


Fig.1-Fab-ms spectra of neutral oligosaccharide fractions: FII-N-7-2' and FII-N-7-6'.

analysis of this tetrasaccharide yielded 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactose, 3,6-di-O-methylglucosamine and 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol in a ratio of 1.6:1:0.7 respectively. These results suggest that the GalNAc-ol residue is substituted by one galactose residue and by one N-acetyllactosamine residue. In order to obtain information on the galactose and N-acetyllactosamine position on the galactosaminitol residue, the fraction II-N-7-2' was subjected to 400-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy.

The chemical shifts (Table 3) of GalNAc-ol H-2 and H-5 ( $\delta=4.390$  and  $\delta=4.280$  respectively) demonstrate that the GalNAc-ol residue is substituted by a ( $\beta 1-3$ )Gal residue and by a ( $\beta 1-6$ )GlcNAc residue. This core is substituted by an additional galactose residue ( $\beta 1-4$ ) linked to a GlcNAc residue (H-1 of Gal  $\delta=4.469$ ). The other data are in agreement with (17).

These results are in favour of the following structure from fraction II-N-7-2':



Fraction II-N-7-6'. - This fraction is constituted of a pentasaccharide as confirmed by GLC molar carbohydrate composition (Table 1), methylation analysis : 2,3,4-tri-O-methylfucose, 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactose, 3,4,6-tri-O-methylgalactose, 3,6-di-O-methylglucosamine and 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol in a molar ratio : 0.4:1.1:1.1:1:0.9 respectively and FAB-MS with the ion at 895 ( $\text{M-H}$ )<sup>-</sup> (Fig.1). These data associated with the results of 400-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy (Table 3) indicate that this oligosaccharide possesses the



Table 2

Molar ratios monosaccharide methyl ethers present in the methanolsates of permethylated fractions obtained by alkaline borohydride treatment of human Meconium.

Fractions	Molar ratio													
	2,3,4- Me <sub>3</sub> Fuc	2,3,4,6- Me <sub>4</sub> Gal	4,7,8,9- Me <sub>4</sub> Neu- NACNe	3,4,6- Me <sub>3</sub> Glc- NACNe	3,4,6- Me <sub>3</sub> Gal- NACNe	3,4,6- Me <sub>3</sub> Gal	2,3,6- Me <sub>3</sub> Gal	2,4,6- Me <sub>3</sub> Gal	3,6- Me <sub>2</sub> Glc- NACNe	4,6- Me <sub>2</sub> Glc- NACNe	6- MeGlc- NACNe	1,4,5,6- Me <sub>4</sub> Gal- NACNe-ol	1,4,5- Me <sub>3</sub> Gal- NACNe-ol	
FII-N-3-3 <sup>a</sup>	-	1.3	-	-	-	-	-	1	0.8	-	1	-	-	
FII-N-7-2 <sup>a</sup>	-	1.6	-	-	-	-	-	1	-	-	-	0.7	-	
FII-N-7-6 <sup>a</sup>	0.4	1.1	-	-	1.1	-	-	1	-	-	-	0.9	-	
FII-N-10-3 <sup>b</sup>	0.5	0.5	-	1.7	-	1	-	0.4	-	0.3	-	0.4	-	
FII-1-1 <sup>c</sup>	-	-	1	-	0.6	-	-	-	-	-	-	1	-	
FII-1-2 <sup>c</sup>	-	-	1	0.8	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	
FII-1-3 <sup>c</sup>	-	0.9	1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	
FII-1-6 <sup>c</sup>	0.2	0.6	1	-	-	-	0.2	0.4	0.4	0.2	0.1	0.7	-	
FII-1-7	-	n.d	n.d	-	-	-	n.d	n.d	-	-	-	n.d	-	
FII-1-9 <sup>c</sup>	0.7	0.4	1	-	0.5	-	-	-	0.5	0.5	-	0.7	-	
FII-2-1 <sup>d</sup>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	
FII-2-2 <sup>d</sup>	-	-	1.8	-	-	-	1	-	-	-	-	0.7	-	
FII-2-4 <sup>d</sup>	-	-	1.8	-	-	-	1	0.8	-	-	-	0.7	-	
FII-2-7 <sup>d</sup>	0.5	-	2.4	-	0.3	-	1	-	0.3	0.7	-	0.8	-	

a: Molar ratio relative to 3,6 Me<sub>3</sub> GlicNACNH<sub>2</sub> c: Molar ratio relative to 4,7,8,9 Me<sub>4</sub> NeuNACMe n.d.= not determined.  
 b: " " " 2,3,6 Me<sub>3</sub> Gal d: " " " 2,3,6 Me<sub>3</sub> Gal



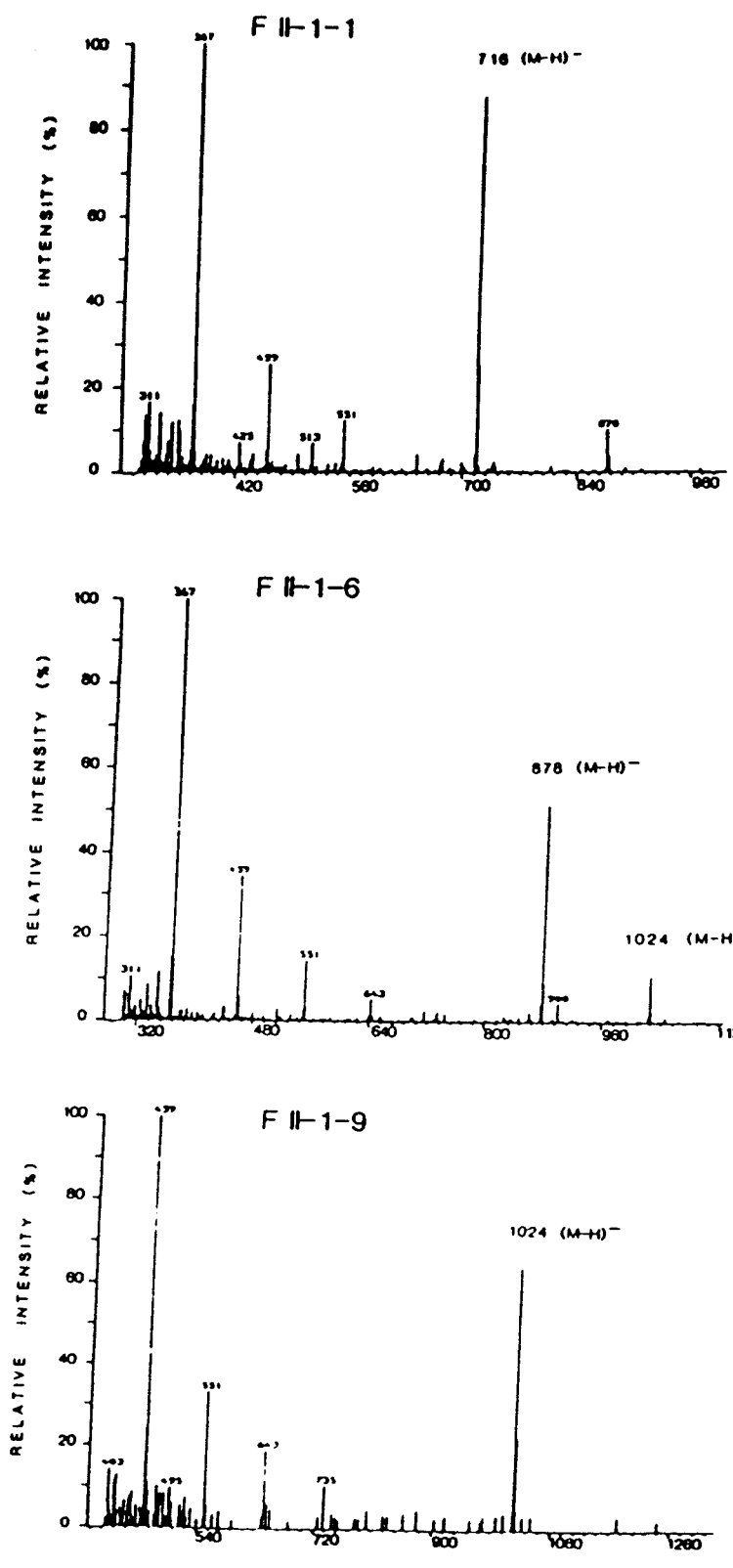


Fig.2-Fab-ms spectra of monoacidic oligosaccharide fractions: F-II-1-1, FII-1-6 and FII-1-9.



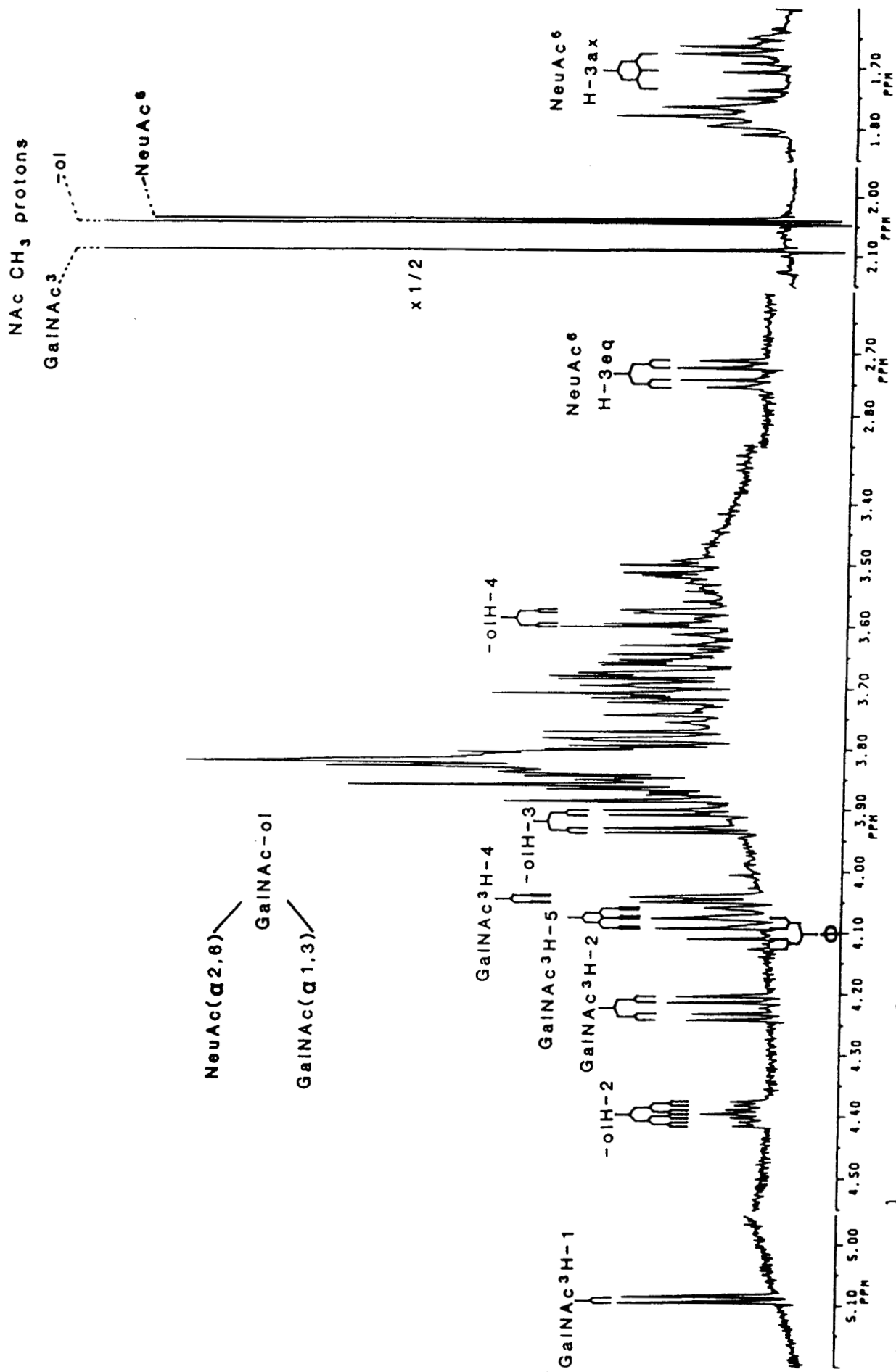


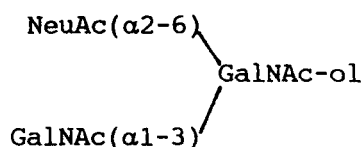
Fig. 4-400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound FII-1-1.

Signals marked by  $\odot$  stem from a frequently occurring, non-protein non-carbohydrate contaminant.

NMR-analysis of fraction II-1-1 shows data (Table 4) in agreement with results obtained by methylation.

The presence of neuraminic acid residue in ( $\alpha$ 2-6) linkage on GalNAc-ol was clearly demonstrated by chemical shifts of H-3 ax ( $\delta$ =1.704) and H-3 eq ( $\delta$ =2.731) (Fig.4). The low-field signal at  $\delta$ =5.086 ppm can be assigned to H-1 of GalNAc ( $\alpha$ 1-3) linked to GalNAc-ol residue. The other signals ( $\delta$ =4.220,  $\delta$ =4.042 and  $\delta$ =4.073) were assigned to H-2, H-4 and H-5 of  $\alpha$ GalNAc in comparison with data already reported (19).

On the basis of these observations the following structure is assigned to fraction II-1-1 :

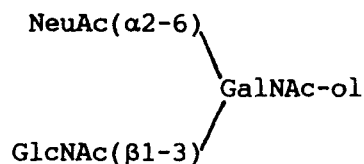


Fraction II-1-2.- On the basis of molar carbohydrate composition (Table 1) and of the result of negative FAB-MS of native oligosaccharide-alditol [ion at  $m/z$  716 ( $M-H$ )<sup>-</sup>], it could be concluded that the fraction II-1-2 is constituted by a trisaccharide. The identification of 1 mole of 4,7,8,9-tetra-O-methylneuraminic acid, 0.8 mole of 3,4,6-tri-O-methylglucosamine and 0.6 mole of 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol (Table 2) demonstrates that the galactosaminitol residue is substituted in position C-3 by a GlcNAc or NeuAc residue and in C-6 by a NeuAc or GlcNAc residue. In order to specify the linkage of GlcNAc and NeuAc residues to GalNAc-ol, the fraction II-1-2 was subjected to 400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

From the NMR spectrum and parameters (Table 4) it could be concluded that the oligosaccharide-alditol FII-1-2 is identical to oligosaccharide R-1 described by Breg et al. (20) in sialyl oligosaccharides from

bronchial mucus glycoproteins. Typical chemical shifts for this glycan are H-2 and H-5 of GalNAc-ol at  $\delta=4.259$  and  $\delta=4.184$ , respectively, and H-3 ax ( $\delta=1.696$ ) and H-3 eq ( $\delta=2.734$ ) of NeuAc ( $\alpha 2-6$ ) linked to GalNAc-ol residue.

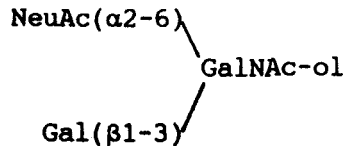
On the basis of these data, the structure of the oligosaccharide-alditol fraction is the following :



Fraction II-1-3.- The molar carbohydrate composition (Table 1), the negative FAB-MS with a major ion at  $m/z$  675 ( $M-H$ )<sup>-</sup> and the methylation analysis (Table 2) (0.9 mole of permethylgalactose, 1 mole of permethylneuraminic acid and 0.9 mole of 1,4,5-tri-O-methyl-galactosaminitol) indicate that the trisaccharide II-1-3 possesses the same structure as trisaccharides II-1-1 and II-1-2 in which galactose residue takes the place of GalNAc and GlcNAc residues respectively. The presence of 0.2 residue of GlcNAc (Table 1) and of permethylglucosamine (Table 2) with the identification in negative FAB-MS of about 30% of ion at  $m/z$  716 ( $M-H$ )<sup>-</sup> indicate that fraction II-1-3 was contaminated by 30% of fraction II-1-2.

The NMR data of oligosaccharide-alditol II-1-3 are identical to those described for a trisaccharide isolated from cow kappa-casein (21,22) with a branched structure Gal( $\beta 1-3$ )[NeuAc( $\alpha 2-6$ )]GalNAc-ol and for an oligosaccharide of porcine submaxillary gland mucin (23).

On the basis of these observations the following structure is assigned to the major oligosaccharide-alditol containing in FII-1-3 :



Fraction II-1-6.- This fraction is constituted of a mixture of three oligosaccharide-alditols: two tetrasaccharides and one pentasaccharide. This pentasaccharide (C) represents about 20% of total fraction as shown by the identification in negative FAB-MS of peak at  $m/z$  1024  $(M-H)^-$  (Fig.2), corresponding to one oligosaccharide with Fuc, Gal, GlcNAc, NeuAc and GalNAc-ol in equimolar proportion. This result was confirmed by the identification of 0.1 residue of fucose in the native fraction II-1-6 (Table 1) and the identification of 0.2 residue of permethylfucose, 0.2 residue of 2,4,6-tri-O-methylgalactose, 0.2 residue of 6-mono-O-methylglucosamine and 0.1 residue of 1,4,5,6-tetra-O-methylneuraminic acid (Table 2). From these results it could be concluded, that the  $(\alpha 2-3)$ sialyl-N-acetyllactosamine sequence is linked to GalNAc-ol in C-3 position and that the GlcNAc residue is substituted by an  $(\alpha 1-3)$ Fuc residue.

The two other oligosaccharides are isomers in the same proportion (peak at  $m/z$  878 in FAB-MS), which differ by the linkage of non-reducing terminal galactose on N-acetylglucosamine in position C-4 and C-3 (oligosaccharides A and B respectively) as demonstrated by the identification in methylation analysis of the equal quantities (0.40 mole) of 3,6- and 4,6-di-O-methylglucosamine. The presence of the 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol (0.7 residue) indicates that these two tetrasaccharides are branched.

These results are confirmed by the NMR-analysis of fraction II-1-6 (Table 4). The chemical shift values of H-3 ax ( $\delta=1.697$ ) and H-3 eq ( $\delta=2.735$ ) of NeuAc together with those of H-2 ( $\delta=4.261$ ) and H-5

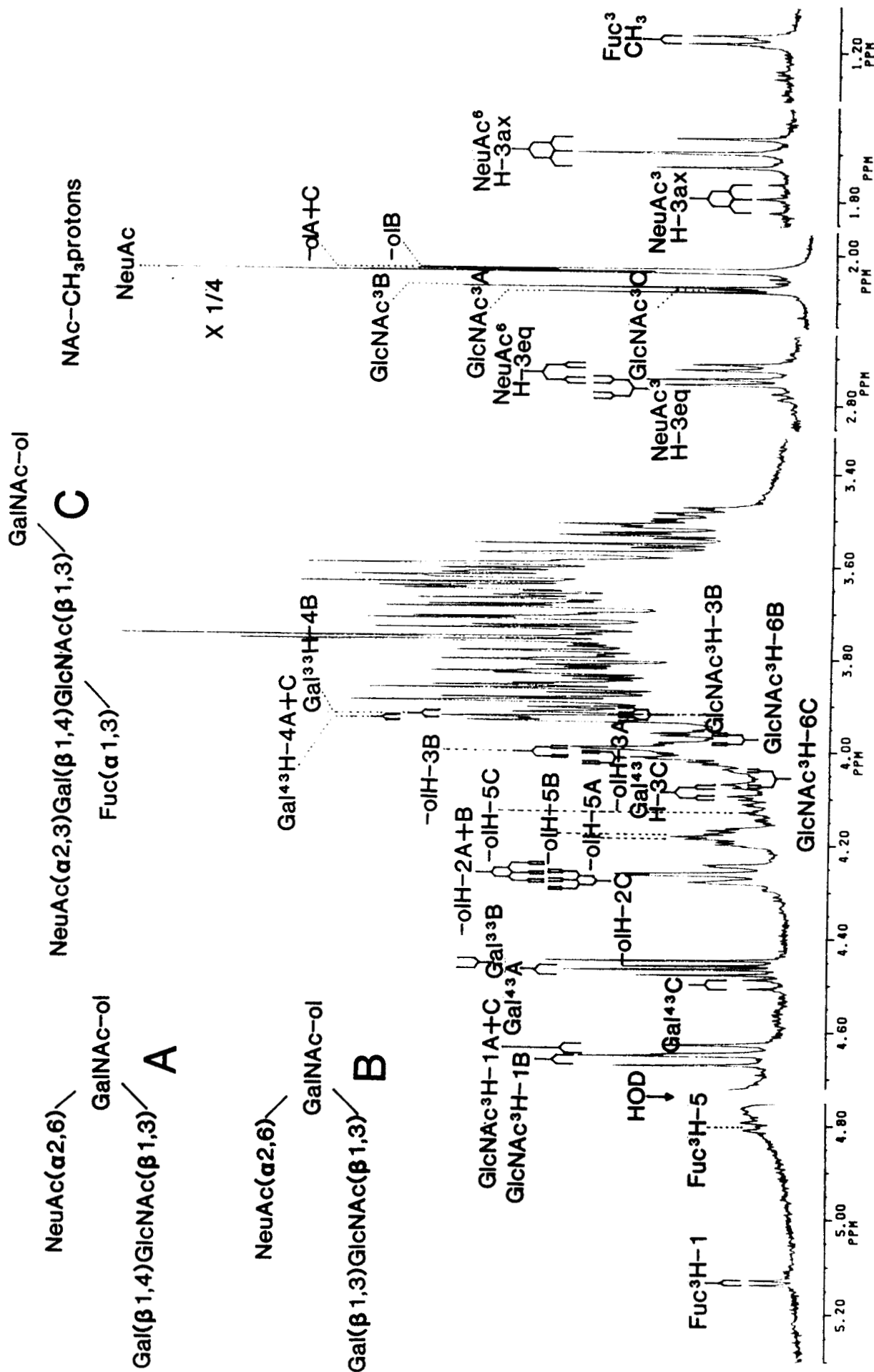
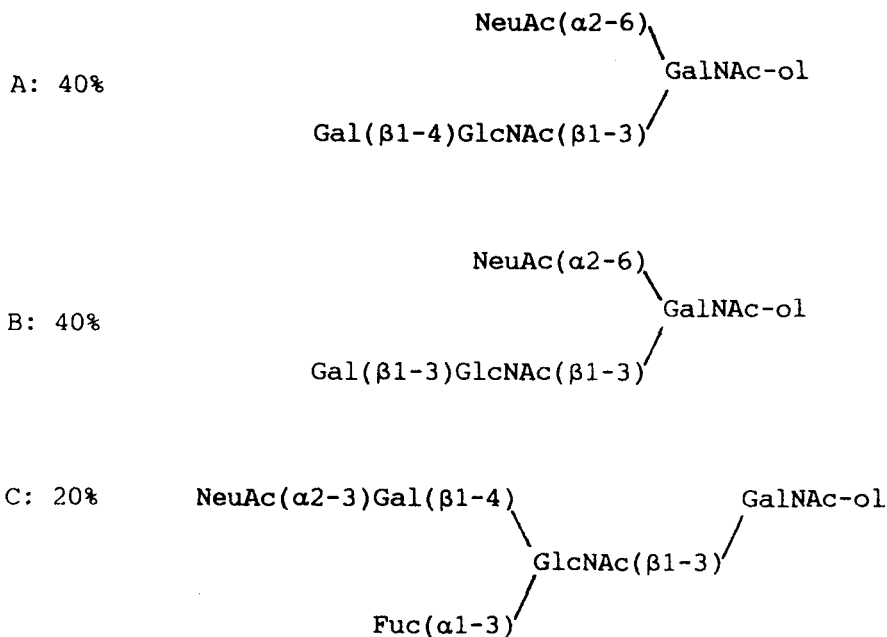


Fig. 5-400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound FII-1-6.

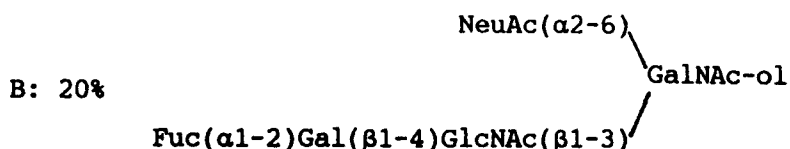
( $\delta=4.182, 4.171$ ) of GalNAc-ol are indicative of the core GlcNAc( $\beta 1-3$ )-[NeuAc( $\alpha 2-6$ )]GalNAc-ol for oligosaccharides A and B. From the chemical shifts of the GlcNAc<sup>3</sup> structural-reporter groups: H-1 ( $\delta=4.635$  and  $4.660$ ) and NAc ( $\delta=2.077$  and  $2.067$ ) in combination with chemical shifts of the Gal H-1 doublets ( $\delta=4.466$  and  $4.455$ ), it is evident that the Gal residues are ( $\beta 1-4$ ) and ( $\beta 1-3$ ) linked to GlcNAc<sup>3</sup> for oligosaccharides A and B respectively (Fig.5). The presence of a doublet of doublet for H-3 of GlcNAc<sup>3</sup> at  $3.918$  ppm is also in full agreement with a ( $\beta 1-3$ ) linkage. The NMR parameters for oligosaccharide C are in accordance with those already reported (47).

On the basis of carbohydrate analysis, FAB-MS, methylation data and 400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, the following structures and proportions can be assigned for the oligosaccharides in fraction FII-1-6:



Fraction II-1-7.- This fraction contains a mixture of two oligosaccharide-alditols as demonstrated in negative FAB-MS by a peak at  $m/z$  1040 and  $m/z$  1024 corresponding to two pentasaccharides with 2 Gal,





FII-1-9.- The molar carbohydrate composition (Table 1) and the result of negative FAB-MS of native oligosaccharide with the ion at  $m/z$  1024  $(M-H)^-$  (Fig.2) suggest that this fraction contains only one pentasaccharide with Fuc, Gal, GlcNAc, NeuAc and GalNAc-ol in equimolar proportion. However, the methylation data (Table 2) allow to identify two isomers. Indeed, the presence of 2,3,4,6-tetra-O-methylgalactose and 6-mono-O-methylglucosamine in a ratio of 0.4:0.5 respectively indicate the presence in this mixture of about 50% of an oligosaccharide with a branched structure Gal4[Fuc3]GlcNAc linked to GalNAc-ol in C-3 position. The identification of 0.5 residue of 3,4,6-tri-O-methylgalactose and 0.5 residue of 4,6-di-O-methylglucosamine suggests the presence in the fraction II-1-9 of about 50% of an other pentasaccharide with a linear branch Fuc(1-2)Gal(1-3)GlcNAc linked to GalNAc-ol in C-3 position.

This fraction FII-1-9 was subjected to 400-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. The NMR data (Fig.6) show also the presence of two pentasaccharide isomers in the same proportion. The chemical shift values for NeuAc H-3 ax (1.696) and H-3 eq (2.732) in combination with the chemical shifts of GalNAc-ol H-2 and H-5 (see Table 4) are in agreement with the core structure GlcNAc( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol. The structural-reporter group resonances of Fuc ( $\delta$  H-1=5.131 and  $\delta$  CH<sub>3</sub> =1.177) are characteristic for the following sequence Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc $\beta$ 1-. The N-acetyl signal at 2.106 ppm is characteristic of the structural element Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol with GalNAc-ol



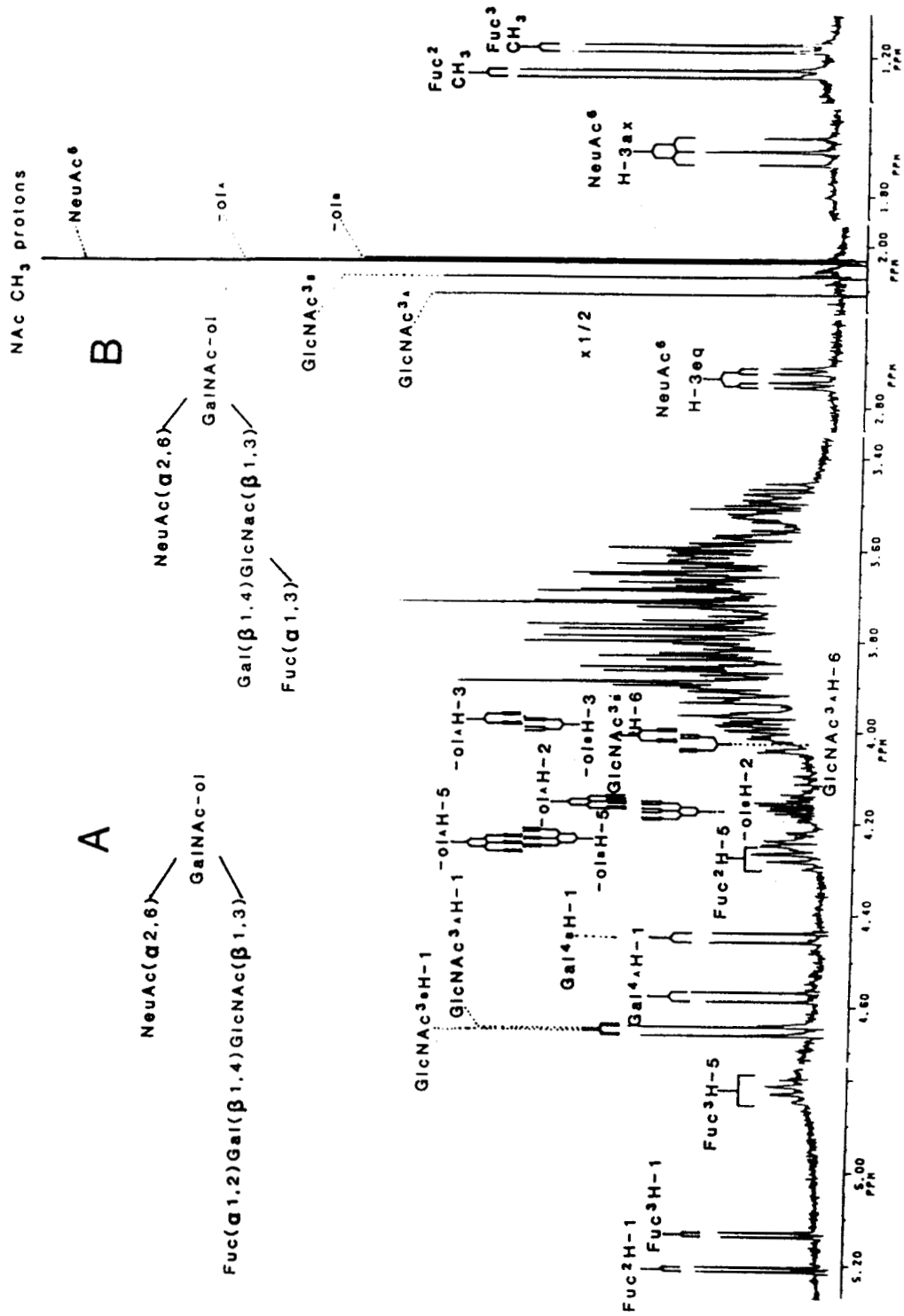
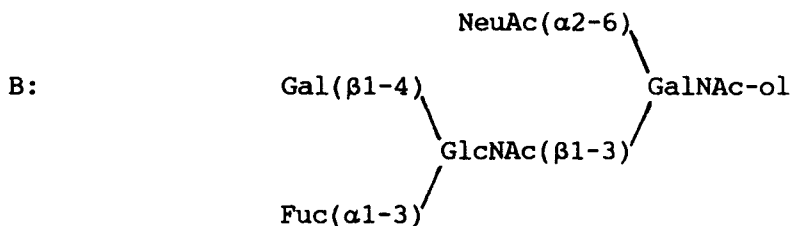
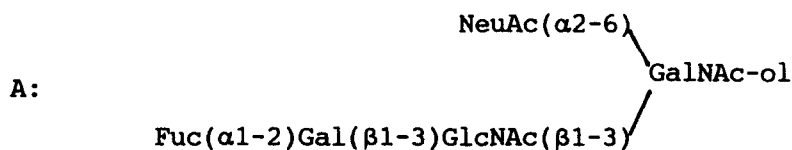


Fig. 6-400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound FII-1-9.

substituted in C-6 position. All other NMR parameters are in agreement with those already reported (20).

Based on chemical and spectroscopic data, the primary structure of these two oligosaccharide-alditols was determined :



FII-2-1.- In regard to molar carbohydrate composition (Table 1) particularly the identification of 1 mole of NeuAc, this oligosaccharide possesses an irregular chromatographic behaviour. The negative FAB-MS analysis gives the explication with the ion at  $m/z$  1104  $(M-H)^-$  corresponding to a pentasaccharide with Fuc, Gal, GlcNAc, NeuAc and GalNAc-ol with equimolar ratio ( $m/z$ : 1025) and containing in addition, one sulfate residue ( $m/z$ : 80)(Fig.3). The permethylation of this oligosaccharide-alditol fraction II-2-1 by the methyl-trifluoromethane sulfonate allow to identify two methyl ether derivatives corresponding to monosaccharides in non reducing terminal position : 1 mole of fucose (identification of 2,3,4-tri-O-methylfucose) and 1 mole of NeuAc (identification of 4,7,8,9-tetra-O-methylneuraminic acid). The presence of 6-mono-O-methylglucosamine is in agreement with the substitution of this monosaccharide by Gal and Fuc in C-4 and C-3 position. Finally, the

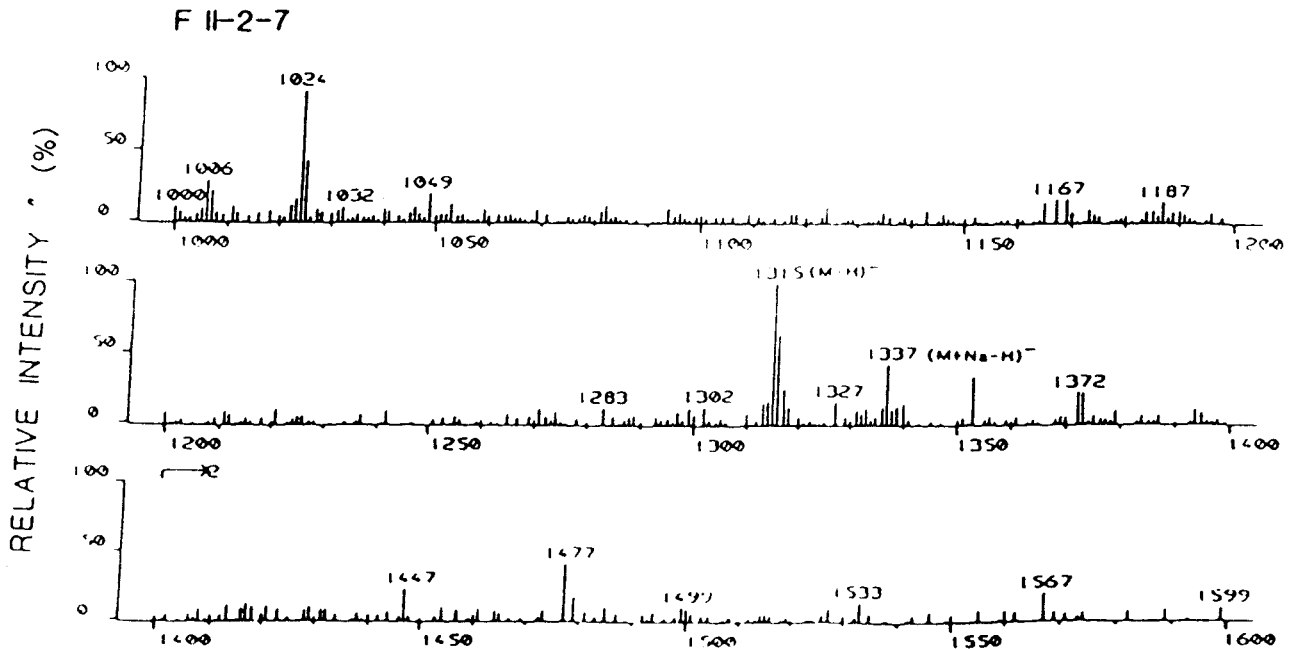
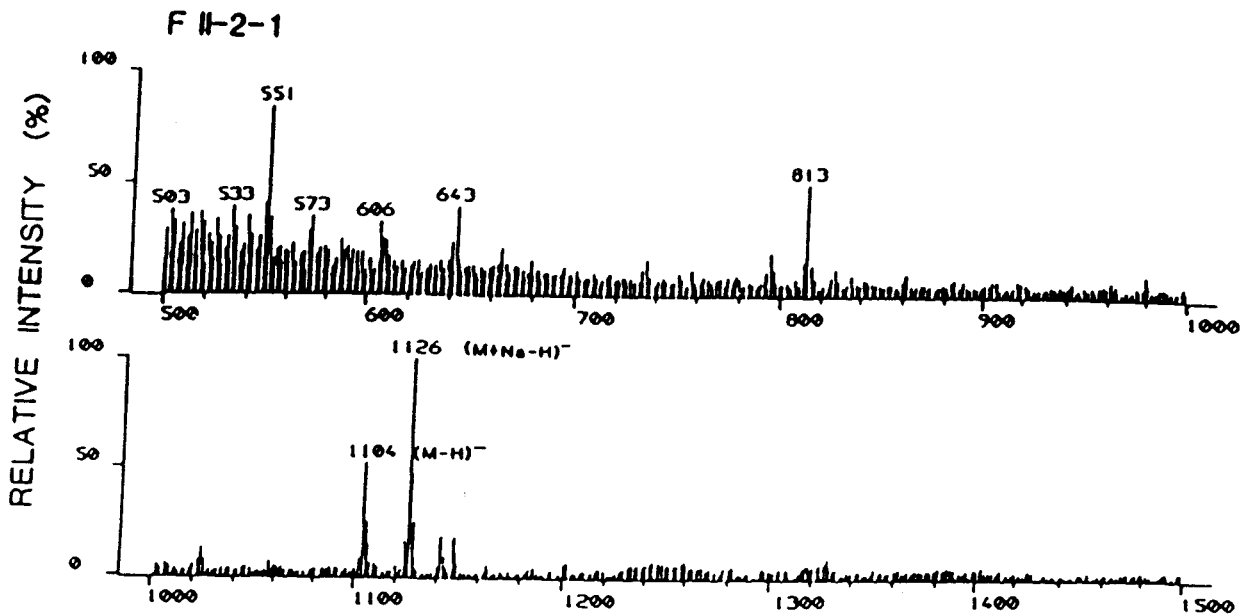


Fig.3-Fab-ms spectra of diacidic oligosaccharide fractions: FII-2-1 and FII-2-7.

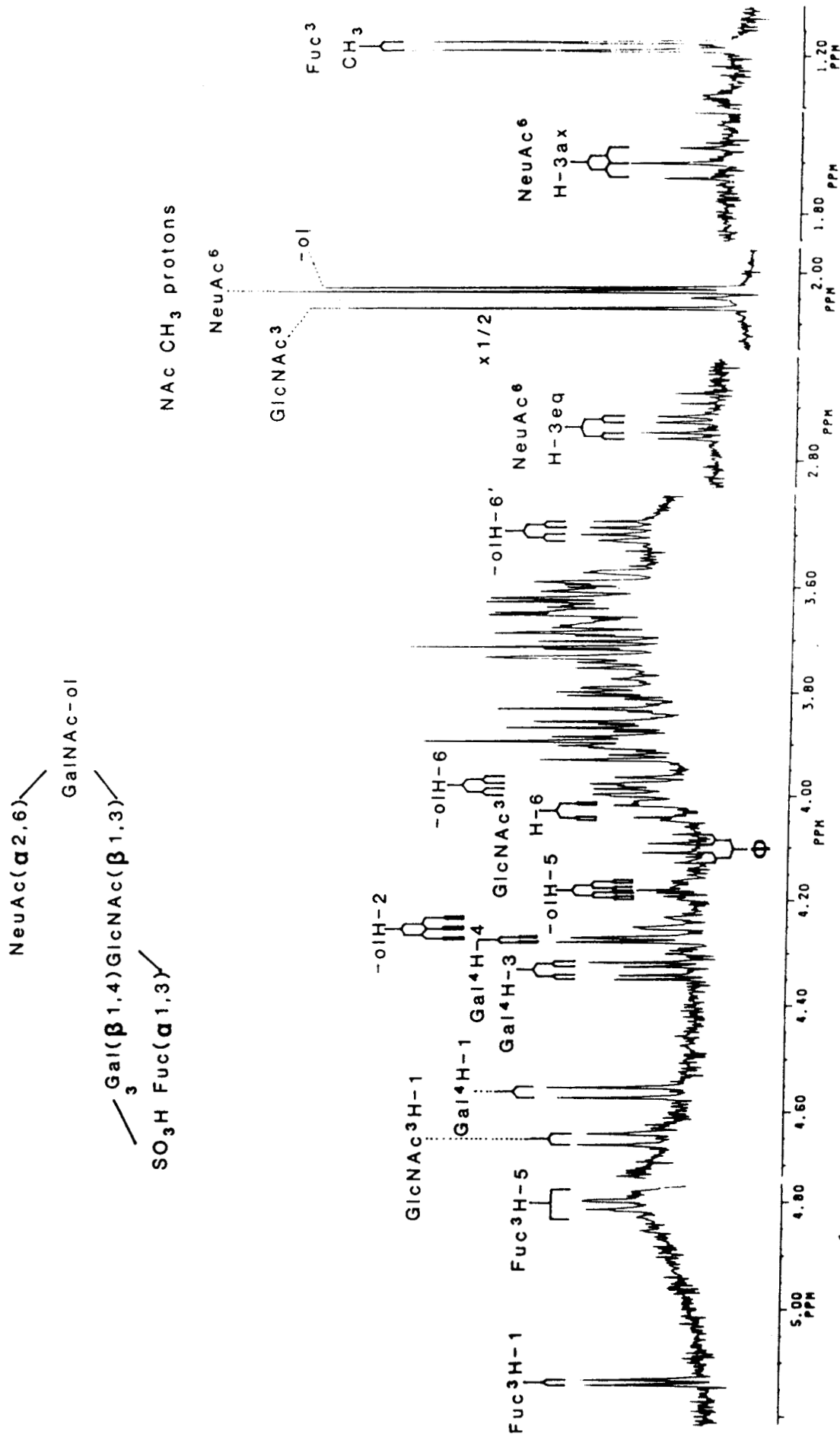


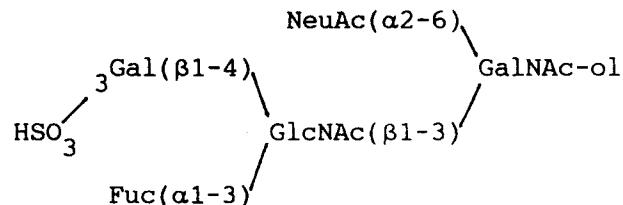
Fig. 7-400MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound FII-2-1.

Signals marked by  $\Phi$  stem from a frequently occurring, non-protein non-carbohydrate contaminant.

identification of a residue of 2,4,6-tri-O-methylgalactose suggests that this monosaccharide is substituted by sulfate group in C-3 position .

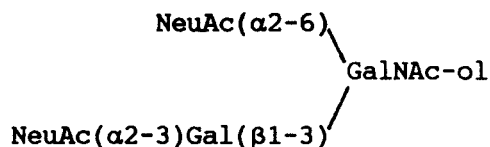
The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of fraction FII-2-1 (Fig.7 and Table 5) indicates the following primary structure: Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)-[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol as described for the oligosaccharide-alditol FII-1-9 B. The chemical shift of H-3 proton of Gal $^{4,3}$  ( $\delta=4.332$ ) of oligosaccharide-alditol II-2-1 in regard to the chemical shift of H-3 proton of Gal $^{4,3}$  ( $\delta=4.083$ ) of oligosaccharide-alditol II-1-6 C with NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal shows a very important downfield shift ( $\delta=0.249$ ) characteristic of a sulfation of non reducing galactose at C-3 position. The same observation can be done by comparison of chemical shifts of H-4 ( $\delta=4.272$ ) of Gal $^{4,3}$  of oligosaccharide II-2-1 and H-4 ( $\delta=3.928$ ) of Gal $^{4,3}$  of oligosaccharide II-1-6 A.

Based on these results, the primary structure of the monosulfated monosialylated oligosaccharide-alditol is :



FII-2-2.- Carbohydrate (Table 1), methylation (Table 2) and negative FAB-MS analysis show that the oligosaccharide-alditol contained in FII-2-2 is a pure classical tetrasaccharide. The presence of 2,4,6-tri-O-methylgalactose, 4,7,8,9-tetra-O-methylneuraminic acid and 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol in a molar ratio 1:1.8:0.7 suggest the classical primary structure NeuAc3Gal3[NeuAc6]GalNAc-ol for this oligosaccharide (21). The NMR parameters (Table 5) confirm this hypothesis .

On the basis of these data, we assign the following structure to oligosaccharide-alditol fraction II-2-2:

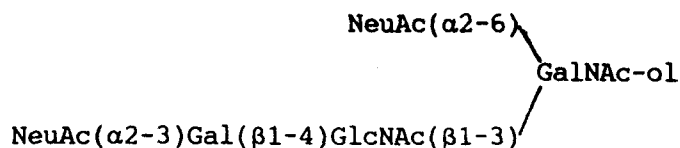


F-II-2-4. -This fraction possesses an additional GlcNAc residue in regard to the fraction FII-2-2 (Table 1). The methylation data presented in Table 2 suggest that oligosaccharide-alditol FII-2-4 contains an ( $\alpha 2-3$ )sialyl-N-acetylactosamine branch linked to the GalNAc-ol residue. As oligosaccharide FII-2-2 we identify 1 mole of 1,4,5-tri-O-methylgalactosaminitol indicating that the second sialic acid residue is linked to GalNAc-ol in C-6 position.

The ion at  $m/z$  1169 ( $M-H$ )<sup>-</sup> in FAB-MS spectrum confirms the pentasaccharidic nature of the fraction II-2-4. This fraction was subjected to 400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

The NeuAc residue present in ( $\alpha 2-6$ ) linkage to GalNAc-ol is characterized by the set of its H-3 chemical shifts ( $\delta$  H-3 ax=1.698,  $\delta$  H-3 eq=2.729). The NeuAc( $\alpha 2-3$ )Gal sequence was demonstrated by chemical shifts of NeuAc H-3 ax ( $\delta$ =1.802) and H-3 eq ( $\delta$ =2.768) and the downfield shift of H-3 of galactose ( $\delta$  H-3 =4.118). The core structure GlcNAc( $\beta 1-3$ )[NeuAc( $\alpha 2-6$ )]GalNAc-ol can be deduced by the chemical shift values of H-2 ( $\delta$ =4.262) and H-5 ( $\delta$ =4.186) of GalNAc-ol. The identification in anomeric region of the spectrum of two doublets demonstrates the  $\beta$  anomeric configuration of GlcNAc and Gal residues ( $\delta$ =4.626 and  $\delta$ =4.540 respectively). This latter value is indicative of a Gal( $\beta 1-4$ )GlcNAc<sup>3</sup> as well as the chemical shift of the GlcNAc<sup>3</sup> structural-reporter group ( $\delta$  H-1=4.626,  $\delta$  H-6=4.020 and  $\delta$  NAc=2.073).

On the basis of these data we assign the following structure to FII-2-4:

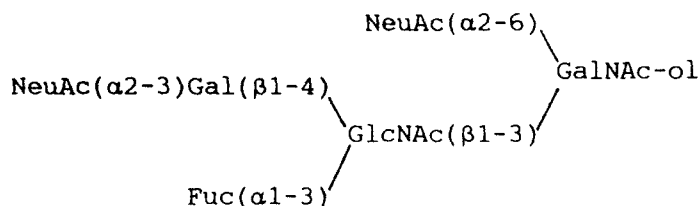


Fraction FII-2-7.- Carbohydrate composition (Table 1) and methylation analysis (Table 2) showed that this oligosaccharide contained two terminal sialic acid residues and one terminal fucose residue. In regard to oligosaccharide fraction II-2-4, this fraction contains 1 additional fucose residue linked to GlcNAc residue in C-3 position (methylation data: 0.5 residue of 2,3,4-tri-O-methylfucose, 0.7 residue of 6-mono-O-methylglucosamine).

The negative FAB-MS spectrum confirms the composition (Table 1) of this oligosaccharide with the ion at  $m/z$  1315  $(M-H)^-$  (Fig.3).

This fraction was subjected to  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. The NMR parameters are compiled in Table 5. As compared with the FII-1-9 B spectrum we can observe that FII-2-7 is an extension by a NeuAc( $\alpha 2-3$ ) linked to Gal<sup>4</sup> residue. This is clearly demonstrated by the set of H-3 chemical shifts of NeuAc residue ( $\delta$  H-3 ax=1.797 and  $\delta$  H-3 eq=2.760) and the effect on the chemical shifts of the Gal<sup>4</sup> structural-reporter group protons ( $\delta$  H-1=4.509 and  $\delta$  H-3=4.113).

Based on these data, oligosaccharide fraction FII-2-7 was assigned the following structure:

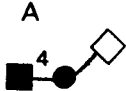
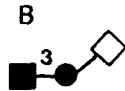
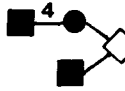

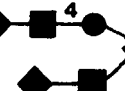


**TABLE 3.**

<sup>1</sup>H-chemical shifts of structural-reporter group protons of constituent monosaccharides for neutral oligosaccharide-alditols isolated from human meconium glycoproteins.

Chemical shifts are relative to internal acetone ( $\delta = 2.225$  ppm in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 27°C). In the table-heading, the structures are represented by a short-hand symbolic notation:  $\diamond$  = GalNAc-ol,  $\blacklozenge$  =  $\alpha$ -GlcNAc,  $\bullet$  =  $\beta$ -GlcNAc,  $\blacksquare$  =  $\beta$ -Gal,  $\square$  =  $\alpha$ -Fuc.

The type of linkage in  $\blacksquare$ — $\bullet$  is specified to be either ( $\beta$ 1-4) or ( $\beta$ -3) linked galactose residue.

Residue	Reporter group	Chemical shift in				
		FII-N-3-3'	FII-N-7-2'	FII-N-7-6'	FII-N-10-3'	
						
GalNAc-ol	H-2	4.287	4.287	4.390	4.402	4.404
	H-3	4.000	4.010	4.060	4.084	4.082
	H-4	n.d.	n.d.	3.466	3.499	3.574
	H-5	4.141	4.137	4.280	4.257	4.265
	H-6	n.d.	n.d.	3.930	n.d.	n.d.
	H-6'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NAc	2.038	2.034	2.067	2.056	2.055
Gal <sup>3(a)</sup>	H-1	-	-	4.464	4.572	4.521
	H-3	-	-	-	-	-
	H-4	-	-	3.900	3.926	3.978
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	-	-	4.560	4.572	4.578
	H-6	-	-	3.998	4.000	4.020
	NAc	-	-	2.063	2.056	2.068
Gal <sup>4,3</sup>	H-1	4.454	-	-	-	-
	H-3	n.d.	-	-	-	-
	H-4	3.926	-	-	-	-
Gal <sup>4,6</sup>	H-1	-	-	4.469	4.471	4.526
	H-4	-	-	3.925	3.926	3.986
Gal <sup>3,3</sup>	H-1	-	4.459	-	-	-
	H-4	-	3.918	-	-	-
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	4.630	4.652	-	-	-
	H-6	4.019	3.953	-	-	-
	NAc	2.083	2.072	-	-	-
GlcNAc <sup>4,3</sup>	H-1	-	-	-	-	4.868
	NAc	-	-	-	-	2.104
GlcNAc <sup>4,4,6</sup>	H-1	-	-	-	-	4.871
	NAc	-	-	-	-	2.070
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	-	-	5.222	-
	H-5	-	-	-	4.275	-
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	1.246	-

(a) A superscript at the name of a sugar residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

The second superscript is used to discriminate between (1-3) or (1-6) linked GlcNAc residue.

n.d. = not determined.



**TABLE 4.**

<sup>1</sup>H-chemical shifts of structural-reporter group protons of constituent monosaccharides for monosialylated oligosaccharide-alditols isolated from human meconium glycoproteins.

Chemical shifts are relative to internal acetone ( $\delta = 2.225$  ppm in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 27°C). In the table-heading, the structures are represented by a short-hand symbolic notation:  $\diamond$  = GalNAc-ol,  $\blacklozenge$  =  $\alpha$ -GalNAc,  $\bullet$  =  $\beta$ -GlcNAc,  $\blacksquare$  =  $\beta$ -Gal,  $\square$  =  $\alpha$ -Fuc,  $\triangle$  = NeuAc ( $\alpha$ 2-3),  $\circ$  = NeuAc ( $\alpha$ 2-6).

The type of linkage in  $\blacksquare$ — $\bullet$  is specified to be either ( $\beta$ 1-4) or ( $\beta$ -3) linked galactose residue.

Residue	Reporter group	Chemical shift in								
		FII-1-1	FII-1-2	FII-1-3	A	B	C	FII-1-7	A	B
GalNAc-ol	H-2	4.393	4.259	4.376	4.261	4.261	4.273	4.386	4.236	4.246
	H-3	3.916	3.984	4.057	4.000	4.011	n.d	4.068	3.972	3.983
	H-4	3.583	3.583	3.537	n.d	n.d	n.d	3.438	n.d	n.d
	H-5	n.d	4.184	4.242	4.182	4.171	4.126	4.268	4.153	4.166
	H-6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3.927	n.d	n.d
	H-6'	n.d	3.490	3.490	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Gal <sup>3(a)</sup>	NAC	2.041	2.031	2.047	2.036	2.032	2.029	2.064	2.030	2.025
	H-1	-	-	4.473	-	-	-	4.531	-	-
	H-3	-	-	-	-	-	-	4.111	-	-
	H-4	-	-	3.895	-	-	-	3.931	-	-
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	4.559	-	-
	H-6	-	-	-	-	-	-	3.994	-	-
	NAC	-	-	-	-	-	-	2.064	-	-
Gal <sup>4,3</sup>	H-1	-	-	-	4.466	-	4.497	-	-	4.445
	H-3	-	-	-	n.d	-	4.083	-	-	n.d
	H-4	-	-	-	3.928	-	3.928	-	-	n.d
Gal <sup>4,6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	4.468	-	-
	H-4	-	-	-	-	-	-	3.923	-	-
Gal <sup>3,3</sup>	H-1	-	-	-	-	4.455	-	-	4.574	-
	H-4	-	-	-	-	3.918	-	-	n.d	-
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	-	4.608	-	4.635	4.660	4.635	-	4.652	4.647
	H-6	-	3.938	-	4.002	3.970	4.052	-	3.940	4.023
	NAC	-	2.078	-	2.077	2.067	2.071	-	2.106	2.066
GalNAc <sup>3</sup>	H-1	5.086	-	-	-	-	-	-	-	-
	H-2	4.220	-	-	-	-	-	-	-	-
	H-4	4.042	-	-	-	-	-	-	-	-
	H-5	4.073	-	-	-	-	-	-	-	-
	NAC	2.087	-	-	-	-	-	-	-	-
NeuAc <sup>3</sup>	H-3ax	-	-	-	-	-	1.793	1.800	-	-
	H-3eq	-	-	-	-	-	2.763	2.774	-	-
	NAC	-	-	-	-	-	2.032	2.034	-	-
NeuAc <sup>6</sup>	H-3ax	1.704	1.696	1.693	1.697	1.697	-	-	1.696	1.696
	H-3eq	2.731	2.734	2.729	2.735	2.735	-	-	2.732	2.732
	NAC	2.034	2.034	2.033	2.036	2.036	-	-	2.034	2.034
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	-	5.206	-
	H-5	-	-	-	-	-	-	-	4.273	-
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	1.235	-
Fuc <sup>3</sup>	H-1	-	-	-	-	-	5.131	-	-	5.131
	H-5	-	-	-	-	-	4.801	-	-	4.819
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	1.171	-	-	1.177

(a) See footnotes Table 3.

**TABLE 5.**

<sup>1</sup>H-chemical shifts of structural-reporter group protons of constituent monosaccharides for monosulphated and disialylated oligosaccharide-alditols isolated from human meconium glycoproteins. Chemical shifts are relative to internal acetone ( $\delta = 2.225$  ppm in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 27°C). In the table-heading, the structures are represented by a short-hand symbolic notation:  $\diamond$  = GalNAc-ol,  $\bullet$  =  $\beta$ -GlcNAc,  $\blacksquare$  =  $\beta$ -Gal,  $\square$  =  $\alpha$ -Fuc,  $\triangle$  = NeuAc ( $\alpha$ 2-3),  $\circ$  = NeuAc ( $\alpha$ 2-6). The type of linkage in  $\blacksquare$ — $\bullet$  is specified to be either (B1-4) or (B1-3) linked galactose residue.

Residue	Reporter group	Chemical shift in			
		FII-2-1	FII-2-2	FII-2-4	FII-2-7
GalNAc-ol	H-2	4.250	4.376	4.262	4.249
	H-3	4.005	4.066	3.991	3.983
	H-4	3.577	3.523	3.597	n.d
	H-5	4.179	4.235	4.186	4.176
	H-6	n.d	n.d	n.d	n.d
	H-6'	3.490	3.473	3.487	3.485
	NAc	2.027	2.042	2.035	2.024
Gal <sup>3(a)</sup>	H-1	-	4.540	-	-
	H-3	-	4.115	-	-
	H-4	-	n.d	-	-
Gal <sup>4,3</sup>	H-1	4.560	-	4.540	4.509
	H-3	4.332	-	4.118	4.113
	H-4	4.272	-	3.962	n.d
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	4.648	-	4.626	4.641
	H-6	4.029	-	4.020	4.015
	NAc	2.068	-	2.073	2.063
NeuAc <sup>3</sup>	H-3ax	-	1.798	1.802	1.797
	H-3eq	-	2.774	2.768	2.760
	NAc	-	2.031	2.031	2.031
NeuAc <sup>6</sup>	H-3ax	1.700	1.690	1.698	1.697
	H-3eq	2.736	2.723	2.729	2.730
	NAc	2.035	2.031	2.031	2.031
Fuc <sup>3</sup>	H-1	5.135	-	-	5.122
	H-5	4.802	-	-	4.804
	CH <sub>3</sub>	1.180	-	-	1.169

(a) See footnotes Table 3.

## DISCUSSION.

Alkaline borohydride treatment of new born meconium release carbohydrates which represent 36% of starting material. The chromatography on a Bio-gel P-6 column allows isolation of an included fraction of oligosaccharide-alditols (16%) from meconium O-glycosyl proteins. The separation by HPLC on an anion-exchange column gave neutral oligosaccharide-alditols which constitute the major fraction (50%) of oligosaccharides O-glycosidically linked from meconium. The acidic oligosaccharide-alditols have been separated in monoacidic (34%) and diacidic (11%) fractions. The remainder material (5%) contains more complex acidic oligosaccharide-alditols which we have not studied.

The neutral oligosaccharide-alditol fractions are characterized by a high heterogeneity. Indeed, we separated 16 oligosaccharidic fractions by HPLC on alkylamine silica column. Nine of them have been refractionated by reversed-phase chromatography. As shown previously (8), each fraction gave about 6 different compounds.

This study describes the primary structure of major oligosaccharide-alditols : 5 neutral, 10 monosialylated, 3 disialylated and one monosulfated monosialylated oligosaccharide-alditols by using permethylation, FAB-MS and 400-MHz proton NMR spectroscopy.

The oligosaccharide-alditol fractions FII-N-3-3' with Gal, GlcNAc and GalNAc-ol in a molar ratio of 1:1:1 and FII-N-7-2' with Gal, GlcNAc and GalNAc-ol in a molar ratio of 2:1:1 possess the same oligosaccharide sequence as oligosaccharide fractions O4 and N1 respectively described by Hounsell et al.(7) from meconium glycoproteins obtained from group O secretors. These oligosaccharides have already been identified in human

colonic mucin (26), in human ovarian cyst glycoproteins (27-30) in bronchial mucins (17,31-33) and in human seminal plasma (34). Other neutral oligosaccharide-alditols are isolated with the same core structure but with an additional fucose residue for the oligosaccharide fraction FII-N-7-6', two additional GlcNAc residue for one oligosaccharide present in FII-N-10-3' and one additional Fuc and GlcNAc residues for the other oligosaccharide present in the same fraction FII-N-10-3'. The oligosaccharide fraction FII-N-7-6' has been shown in bronchial mucins of patients with cystic fibrosis (31-32).

In the fraction FII-N-10-3', the major oligosaccharide has been observed in the carbohydrate moiety of pig stomach cell line (18) while the minor oligosaccharide has not been previously described. With the Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)] sequence ( $\beta$ 1-6) linked to GalNAc-ol this oligosaccharide possesses the determinant of the blood group X antigen (45).

Acidic oligosaccharide-alditols from human meconium glycoproteins have not yet been isolated. About the monosialylated trisaccharide-alditols, the oligosaccharide fraction FII-1-3 has been described in several biological materials (23, 35-44), the oligosaccharide-alditol FII-1-2 is present in bronchial mucin from a patient suffering from bronchiectasis (Van Halbeek, H., unpublished results), in oligosaccharide structures of human colonic mucin (26), in oligosaccharides obtained from bovine submaxillary mucin (39, 40) and in human rectal adenocarcinoma glycoproteins (44). The oligosaccharide fraction FII-1-1 differs from oligosaccharide fraction FII-1-2 by aminosugar: GalNAc instead of GlcNAc. This oligosaccharide has also been described by Kurosaka et al. (44). The disaccharide GalNAc( $\alpha$ 1-3)-GalNAc-ol (R2) described by Hounsell et al.(7) in oligosaccharide-alditols from meconium can occur from the oligosaccharide fraction FII-1-1 : GalNAc( $\alpha$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol during the partial acid

used to remove fucose and sialic acid. The oligosaccharides from fractions FII-1-6, FII-1-7, FII-1-9 were found in bronchial mucins (20). The oligosaccharide FII-1-6 A has also been described in human colonic mucin by Podolsky (26), as the oligosaccharide FII-1-6 C carrying the determinant of the blood group sialylated X antigen by Lamblin et al.(47). The oligosaccharide FII-1-6 B is a novel structure.

In the disialylated fraction, we found the classical tetrasaccharide FII-2-2 first described by Thomas and Winzler (35) and for numerous glycoproteins (36-38,43,46,48). The two other disialylated oligosaccharides FII-2-4 and FII-2-7 and the monosialylated monosulfated FII-2-1 are novel structures. Also present in fraction FII-2-7 is the determinant of the blood group X antigen. The oligosaccharide FII-2-1 possesses the same core structure as oligosaccharide FII-2-7 in which one sialic acid residue is replaced by one sulfate group linked to C-3 position of galactose residue. It is interesting to observe that except for oligosaccharide fractions FII-1-6 C and FII-1-7 A, the monosialylated and disialylated oligosaccharides have the C-6 position of GalNAc-ol substituted by an  $\alpha$ NeuAc residue indicating the high activity of the N-acetylgalactosaminide-( $\alpha$ 2-6)sialyltransferase in foetal intestinal mucosa.

Acknowledgments -We would like to acknowledge the expert assistance of Catherine Alonso and Jocelyne Celen in the preparation of this manuscript.

\* This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.A.n°217) and by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. They are grateful to the Conseil

Régional de la Région Nord-Pas de Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Ministère de l'Education Nationale, the Association de la Recherche sur le Cancer and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale for their contribution in the acquisition of the 400 MHz-NMR apparatus and the Kratos MS 50 RF.

**REFERENCES**

- 1 - Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D., and Evans, M.J. (1981) Nature **292**, 156-158.
- 2 - Gooi, H.C., and Feizi T. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. **106**, 539-545.
- 3 - Gooi, H.C., Uemura, K., Edwards, P.A.W., Foster, C.S., Pickering, N.J., and Feizi T. (1983) Carbohydr.Res. **120**, 293-302.
- 4 - Feizi, T., and Childs, R.A. (1985) Trends Biochem. Sci. **10**, 24-29.
- 5 - Herlant-Peers, M.-C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., van Halbeek, H., Veldink, G.A., and Vliegenthart, J.F.G. (1981) Eur.J.Biochem. **117**, 291-300.
- 6 - Cache, P. (1986) Thesis University of Lille, France.
- 7 - Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C., and Feizi, T. (1985) Eur.J.Biochem. **148**, 367-377.
- 8 - Capon, C., Cache, P., Leroy, Y., Strecker, G., Montreuil, J., and Fournet, B. (1988) J.Chromatogr. Biomed.Appl. **425**, 35-45.
- 9 - Aminoff, D., Gathman, W.D., Mc Lean, C.M., and Yadoma, T. (1980) Anal.Biochem. **101**, 44-53.
- 10 - Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G., and Clamp, J.R. (1975) Biochem.J. **151**, 491-495.
- 11 - Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., and Strecker, G. (1986) in Carbohydrate Analysis, a practical approach, Champlin, M.F., and Kennedy, J.F., eds., IRL press Oxford, 143-204.

- 12 - Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) Carbohydr. Res. **131**, 209-217.
- 13 - Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y., and Montreuil, J. (1981) Anal.Biochem. **116**, 489-502.
- 14 - Dell, A., Oates, J.E., Morris, H.R., and Egge, H. (1983) Int.J.Mass.Spectrom.Ion Phys. **46**, 415-418.
- 15 - Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L., and van Halbeek, H. (1983) Adv.Carbohydr.Chem. and Biochem. **41**, 209-374.
- 16 - Baenziger, J.U., and Natowicz, N. (1981) Anal.Biochem. **112**, 357-361
- 17 - Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Hull, W.E., Lamblin, G., Lhermitte, M., Boersma, A., and Roussel, P. (1982) Eur.J.Biochem. **127**, 7-20.
- 18 - Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Kochetkov, N.K., Arbatsky, N.P., and Derevitskaya, V.A. (1982) Eur.J.Biochem. **127**, 21-29.
- 19 - Feeney, J., Frenkiel, T.A., and Hounsell, E.F. (1986) Carbohydr.Res. **152**, 63-72.
- 20 - Breg, J., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Lamblin, G., Houvenaghel, M.C., and Roussel, P. (1987) Eur.J.Biochem. **168**, 57-68.
- 21 - Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Fiat, A.-M., and Jolles, P. (1980) Biochim.Biophys.Acta **623**, 295-300.



- 22 - Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L., van Halbeek, H., and Haverkamp, J. (1982) Cell Biol.Monogr. **10**, 127-172.
- 23 - Savage, A.V., Koppen, P.L., Schiphorst, W.E.C.M., Trippelwitz, L.A.W., van Halbeek H., Vliegenthart, J.F.G. and Van den Eijnden, D.H. (1986) Eur.J.Biochem. **160**, 123-129.
- 24 - Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Fiat, A.-M., and Jolles, P. (1981) FEBS Lett. **133**, 45-50.
- 25 - Savage, A.V., D'Arcy, S.M., and Donaghue, C.M. (1987) in Glycoconjugates ( Montreuil, J., Verbert, A., Spik, G., Fournet, B., eds)proceedings of the IXth International Symposium Lille, France, A-11.
- 26 - Podolsky, D.K. (1985) J.Biol.Chem. **260**, 8262-8271.
- 27 - Rovis, L., Anderson, B., Kabat, E.A., Gruezo, F., Liao, J. (1973) Biochemistry **12**, 5340-5354.
- 28 - Maisonrouge-Mcauliffe, F, and Kabat, E.A. (1976) Arch.Biochem.Biophys.**175**, 90-113.
- 29 - Wu, A., Kabat, E.A., Nilsson, B., Zopf, D.A., Gruezo, F.G., Liao, J. (1984) J.Biol.Chem. **259**, 7178-7186.
- 30 - Mutsaers, J.H.G.M., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Wu, A.M.,Kabat, E.A. (1986) Eur.J.Biochem. **157**, 139-146.
- 31 - Lamblin, G., Boersma, A., Lhermitte, M., Roussel, P., Mutsaers, J.H.G.M., van Halbeek, H., and Vliegenthart, J.F.G. (1984) Eur.J.Biochem. **143**, 227-236.
- 32 - Klein, A., Lamblin, G., Lhermitte, M., Roussel, P., Breg, J., van Halbeek, H. & Vliegenthart, J.F.G. (1988) Eur.J.Biochem. **171**, 631-642.
- 33 - Breg, J., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Klein, A., Lamblin, G. & Roussel, P. (1988) Eur.J.Biochem. **171**, 643-654

- 34 - Hanisch, F.G., Egge, H., Peter-Katalinic, J., and Uhlenbruck, G. (1986) Eur.J.Biochem. 155,239-247.
- 35 - Thomas, D.B., and Winzler, R.J. (1969) J.Biol.Chem. 244, 5943-5946.
- 36 - Lisowska, E., Duk, M. (1980) Carbohydr.Res. 79, 103-113.
- 37 - Edge, A.S.B., Van Langenhove, A., Reinhold, V., and Weber, P. (1986) Biochemistry 25, 8017-8024.
- 38 - Yamashita,T., Murayama, J.I., Utsumi, and H., Hamada, A. (1985) Biochem.Biophys.Acta 839, 26-31.
- 39 - Lombart, C.G.,and Winzler, R.J. (1974) Eur.J.Biochem. 49, 77-86.
- 40 - Tsuji, T., and Osawa, T. (1986). Carbohydr. Res. 151, 391-402.
- 41 - Nasir-Ud-Din, Jeanloz, R.W., Lamblin, G., Roussel, P., van Halbeek, H., Mutsaers, J.H.G.M., and Vliegenghart, J.F.G. (1986) J.Biol.Chem. 261, 1992-1997.
- 42 - Yurewicz, E.C., Matsuura, F., and Moghissi, K.S. (1987) J.Biol.Chem. 262, 4733-4739.
- 43 - Fournet, B., Fiat, A.M., Alais, C., and Jolles, P. (1979) Biochim.Biophys.Acta 576, 339-346.
- 44 - Kurosaka, A., Nakajima, H., Funakoshi, I., Matsuyama, M., Nagayo, T. and Yamashina (1983) J.Biol.Chem. 258, 11594-11598.
- 45 - Solter, D., and Knowles, B. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 5565-5569.
- 46 - Lecat, D., Lemonnier, M., Derappe, C., Lhermitte, M., van Halbeek, H., Dorland, L., and Vliegenghart, J.F.G. (1984) Eur.J.Biochem. 140, 415-420.

47 - Lamblin, G., Boersma, A., Klein, A., Roussel, P., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) J.Biol.Chem. 259, 9051-9058.

48 - Nato, F., Goulut, C., Bourillon, R, van Halbeek, H., and Vliegenthart, J.F.G. (1986) Eur.J.Biochem. 159, 303-308.

**D - Etude des fractions glucidiques lourdes obtenues après hydrolyse  
alcaline du méconium**

**D - 1 : Matériels et méthodes**

- L'hydrolyse alcaline en milieu réducteur et la préparation de la fraction lourde FI par gel filtration ont été décrites dans l'article 2;

- Les constituants glucidiques de cette fraction ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne d'AX-10 selon le protocole expérimental décrit dans l'article 2 (Expérimental);

- Les compositions molaires en monosaccharides des différentes fractions glucidiques ont été effectuées après méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides triméthylsilylés;

- Les tests d'agglutination par les anticorps anti-Sd<sup>a</sup> ont été réalisés au CNTS et décrits dans le paragraphe B-2-4 concernant les mucines urinaires.

**D - 2 : Résultats et discussion**

La chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Micropak AX-10 de la fraction lourde FI, obtenue par Biogel P-6 après hydrolyse alcaline du méconium, fournit 5 fractions : une fraction neutre et quatre fractions acides. Le Tableau VIII (p.83) donne la composition en monosaccharides de chacune des fractions. Celles-ci se caractérisent par des concentrations importantes en fucose et la présence de N-acétylgalactosamine dans les fractions sialylées, qui peuvent en conséquence contenir le déterminant de groupe sanguin Sd<sup>a</sup>.

Ceci est confirmé par les tests d'agglutination (Tableau IX, p.84) qui indiquent une activité de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> importante dans les deux fractions les plus acides : FI-3 et FI-4.

Nous constatons que l'activité de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> du méconium n'est plus portée par les chaînes O-glycosidiques légères

TABLEAU VIII

COMPOSITION MOLLAIRE DES FRACTIONS OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR COLONNE DE MICROPAK AX-10, DES OLIGOSACCHARIDE-ALDITOLS DE LA FRACTION LOURDE (FI) DU MECONIUM.

Fractions	Rapports molaires						
	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc-ol
FI	0.5	1	0.2	0.3	1.1	0.3	0.09
FI-N	0.5	1	0.2	0.2	1.1	-	0.2
FI-1	0.4	1	0.3	0.2	1.1	0.1	0.1
FI-2	0.5	1	0.3	0.1	1.1	0.1	0.1
FI-3	0.4	1	0.2	0.2	0.7	0.1	0.1
FI-4	0.2	1	0.2	0.4	0.9	0.3	0.06

On prend le rapport molaire du galactose (Gal) égal à 1.

TABLEAU IX

INHIBITION A L'AIDE DES FRACTIONS LOURDES DU MECONIUM DE L'AGGLUTINATION  
DES ERYTHROCYTES Cad PAR LE SERUM ANTI-Sd<sup>a</sup>.

Inhibiteur	Concentration minimum ( $\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ ) donnant une inhibition complète de l'agglutination
FI	25
FI-N	>50
FI-1	>50
FI-2	>50
FI-3	12.5
FI-4	6.75

obtenues par  $\beta$ -élimination, mais plus particulièrement, par des O-glycannes de masse moléculaire importante ou\et des fractions N-glycanniques. Ce résultat est à rapprocher de celui de Donald et al. (1984) qui démontrent que l'activité Sd<sup>a</sup> de la glycoprotéine urinaire de Tamm-Horsfall est portée par les N-glycannes.

Les techniques classiques de séparation des oligosaccharides par chromatographie en phase normale ou en phase réverse ne nous ont pas permis d'isoler des oligosaccharides à partir des cinq fractions de la chromatographie d'échange d'ions. L'utilisation d'endo- $\beta$ -galactosidase sur la fraction FI devrait nous permettre d'identifier des motifs oligosaccharidiques, porteurs de l'activité Sd<sup>a</sup>.

### **E - Conclusions**

1 - Le traitement alcalin en milieu réducteur des glycopeptides du méconium, aboutit à une libération incomplète des glycannes. Nous ne pouvons donner d'explications à ces faibles rendements (36 % de sucres libérés). Aminoff et al. (1980) constatent que le nombre de résidus Ser et Thr glycosylés, la longueur des chaînes glycanniques et la proximité de résidus d'acide sialique, intervenaient dans le rendement de la libération des glycannes par hydrolyse alcaline.

2 - Les premiers travaux que nous avons réalisés sur le fractionnement des oligosaccharide-alditols du méconium, nous indiquent une très grande hétérogénéité. En effet, sur la seule fraction légère, obtenue par gel filtration, nous avons pu, à l'aide des différentes techniques de chromatographie liquide haute performance, isoler un minimum de 46 oligosaccharides neutres, 15 fractions monosialylées et 13 fractions disialylées et/ou monosialylées monosulfatées. Les fractions oligosaccharidiques plus chargées n'ont pas encore été étudiées.

Slomiany et al. (1984) observent la même hétérogénéité dans l'étude des mucines gastriques humaines et des mucines coliques de Rat, ainsi que Podolski (1985) dans l'étude des mucines coliques humaines et Klein et

al. (1988), Breg et al. (1988), Van Halbeek et al. (non publié) dans les mucines bronchiques.

3 - Cette grande hétérogénéité de glycanes a pour conséquence, pour certains d'entre eux, l'isolement de trop faible quantité permettant une approche structurale. C'est ainsi que nous n'avons pu étudier que les fractions majeures de quantité égale ou supérieure à 30µg.

4 - Les études de structures primaires nous ont permis de décrire 19 oligosaccharides: 12 possèdent le noyau oligosaccharidique de type 3, 4 possèdent le noyau oligosaccharidique de type 2 et un possède le noyau oligosaccharidique GalNAC(α1-3)GalNAC.

Ces structures présentent des éléments caractéristiques communs aux mucines gastriques, coliques et bronchiques déjà citées: la plupart d'entre elles possèdent un noyau oligosaccharidique de type 3.

Pour la majorité des oligosaccharides sialylés, l'acide sialique se conjugue sur la GalNAC du point d'attache par une liaison (α2-6). Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Slomiany et al. (1980) et Brockhausen et al. (1985) qui suggèrent vis à vis du noyau oligosaccharidique de type 3, une plus forte activité de l'(α2-6)sialyltransférase responsable de la synthèse de chaînes oligosaccharidiques courtes, au regard de la (β1-6)-N-acétylglucosaminyltransférase.

5 - La détermination structurale de l'antigène Sd<sup>a</sup> n'a pu être menée à son terme. Sa recherche nous a permis de le localiser uniquement par des moyens immunochimiques, sur les chaînes lourdes du méconium tandis que les techniques classiques d'HPLC se sont révélées insuffisantes pour mener à bien son isolement. Par contre, nous avons pu identifier au niveau des oligosaccharides FII-1-6 (C), FII-1-9 (B), FII-2-1 et FII-2-7, le déterminant de groupe sanguin X.



**CONCLUSIONS      GENERALES**

Les recherches que nous avons effectuées sur les antigènes glucidiques de groupe sanguin s'inscrivent dans le cadre des thématiques du Laboratoire.

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

1 - L'étude des structures oligosaccharidiques des membranes érythrocytaires de différents donneurs Cad nous a permis, d'une part, de confirmer les travaux antérieurs de Blanchard et al. (1983) et Herkt et al. (1985) concernant la structure primaire du déterminant antigénique Cad : GalNAc( $\beta$ 1-4)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)]Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc, d'autre part, de mettre en évidence des différences quantitatives quant au nombre de sites de glycosylation, porteurs du déterminant Cad;

2 - Les recherches de localisation du site de l'antigène Sd<sup>a</sup> de donneur Sd(a+) ont montré que ce déterminant ne se situait pas sur les glycoprotéines des membranes érythrocytaires mais plutôt sur des gangliosides (Blanchard et al., 1985). La structure primaire de l'extrémité terminale non réductrice de ce ganglioside porteur de l'activité Sd<sup>a</sup> est tout à fait similaire à celle de l'extrémité non réductrice du O-glycane de la glycophorine Cad : GalNAc( $\beta$ 1-4)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)]Gal-. Cependant, cette unité trisaccharidique n'est pas responsable à elle seule de l'activité Sd<sup>a</sup> puisque le ganglioside GM2 qui contient cette même séquence trisaccharidique n'est pas actif (Donald et al., 1983);

3 - Nous avons pu localiser l'activité de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> dans les fractions O-glycosidiques légères, obtenues à partir de mucines urinaires de sujet Sd(a+). Ce résultat diffère de celui obtenu sur la glycoprotéine urinaire de Tamm-Horsfall qui porte ce déterminant sur les structures N-glycanniques;

4 - La recherche de l'activité de groupe sanguin Sd<sup>a</sup> dans les mucines méconiales et plus particulièrement sur les produits de  $\beta$ -élimination, indique qu'elle se situe sur des structures oligosaccharidiques lourdes. Les techniques d'investigation classiques à base de fractionnement par HPLC ne nous ont pas permis l'isolement de ou des oligosaccharides porteurs de l'activité. Il conviendrait d'envisager une autre approche expérimentale:

l'utilisation de la chromatographie d'affinité, par exemple, nous permettant l'obtention de fractions enrichies en GalNac terminale non réductrice (Helix aspersa , Salvia horminum...) et l'emploi d'endo- $\beta$ -D-galactosidase afin d'isoler le motif pentasaccharidique;

5 - La fraction oligosaccharidique légère obtenue par hydrolyse alcaline en milieu réducteur de méconium ne présente pas d'affinité par les anticorps anti-Sda. Cependant, son étude s'est avérée particulièrement intéressante par la variété et la richesse des glycannes qu'elle possède. Nous avons pu ainsi isoler quelques oligosaccharides neutres déjà décrits dans la littérature et un certain nombre d'oligosaccharides acides décrits pour la première fois dans le méconium et dont quatre d'entre eux constituent des structures nouvelles;

6 - Parmi les structures oligosaccharidiques décrites, certaines possèdent des activités de groupe sanguin comme l'antigène X et le sialyl-X. Ces fractions oligosaccharidiques constituent des antigènes de différenciation et/ou des antigènes tumoraux. L'utilisation de ces marqueurs pour la production d'anticorps revêt une importance toute particulière dans les diagnostics des cancers et le ciblage des drogues cytotoxiques;

7 - L'étude des mucines méconiales doit se poursuivre au niveau des fractions légères mineures et des fractions lourdes dont nous n'avons ébauché que le fractionnement et qui représente 50 % environ du matériel glycoprotéique du méconium. Ces fractions lourdes renferment l'antigène Sda et probablement d'autres activités de groupes sanguins qu'il serait intéressant d'étudier.

**B I B L I O G R A P H I E**

ABEIJON, C., HIRSCHBERG, C.B.

(1987) J. Biol. Chem., 262, 4153-4159

AFONSO, A-M.M., CHARLWOOD, P.A., MARSHALL, R.D.

(1981) Carbohydr. Res. 89, 309-319

AMINOFF D., GATHMANN, W.D., Mc LEAN, C.M., YADOMAE, T.

(1980) Anal. Biochem. 101, 44-53

ANSTEE, D.J., MAWBY, W.J., TANNER, M.J.A.

(1979) Biochem. J. 183, 193-203

ANSTEE, D. J.

(1981) Seminars in Hematology 18, 13-31

BAKER, A.P., SAWYER, J.L.

(1975) Biochem. Med. 14, 42

BARTALENA, L., ROBBINS, J.

(1984) J. Biol. Chem. 259, 13610-13614

BASU, M., BASU, S.

(1973) J. Biol. Chem. 248, 1700-1706

BASU, M., BASU, S.

(1984) J. Biol. Chem. 259, 12557-12562

BERGH, M.L.E., HOOGHWINKEL, G.J.M., VAN DEN EIJDEN, D.H.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 7430-7436

BETTERIDGE, A., WATKINS, W.M.

(1985) Glycoconjugate J. 2, 61-78

BETTERRIDGE, A., WATKINS, W.M.

(1986) Biochem. Soc. Trans. 13, 1126-1127

BEYER, T.A., REARIEK, J.I., PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., SADLER, J.E., HILL, R.L.

(1979) J; Biol. Chem. 254, 12531-12541

BEYER, T.A., SADLER, J.E., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., HILL, R.L.

(1981) Adv. Enzymol. 52, 23-175

BIRD, G.W.G., WINGHAM, J.

(1971) Vox Sang. 20, 55-61

BIRD, G.W.G., WINGHAM, J.

(1972) Vox Sang. 22, 362-363

BIRD, G.W.G., WINGHAM, J.

(1976) J. Immunogenet. 3, 297-309

BLANCHARD, D., CARTRON, J.-P., FOURNET, B., MONTREUIL, J., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 7691-7695

BLANCHARD, D., CAPON, C., LEROY, Y., CARTRON, J.-P., FOURNET, B.

(1985a) Biochem. J. 232, 813-818

BLANCHARD, D., PILLER, F., GILLARD, B., MARCUS, D., CARTRON, J.-P.

(1985b) J. Biol. Chem. 260, 7813-7816

BLANCHARD, D.

(1986) Bases biochimiques des spécificités de groupe sanguin Cad et Sd<sup>a</sup>.  
Thèse de Doctorat d'Etat-Es-Sciences, Paris VII.

BLANKEN, W.M., HOOHWINKEL, G.J.M., VAN DEN EIJNDEN, D.H.

(1982) Eur. J. Biochem. 127, 547-552

BREG, J., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G., KLEIN, A., LAMBLIN, G., ROUSSEL, P.

(1988) Eur. J. Biochem. 171, 643-654

BROCKHAUS, M., MAGNANI, J.L., HERLYN, M., BLASZCZYK, M., STEPHENSKI, Z.,  
KOPROWSKI, M., GINSBURG, V.

(1982) Arch. Biochem. Biophys. 217, 647-651

BROCKHAUS, M., WYSOCKA, M., MAGNANI, J.L., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.,  
GINSBURG, V.

(1985) Vox Sang. 48, 34-38

BROCKHAUSEN, I., MATTA, K.L., ORR, J., SCHACHTER, H.

(1985) Biochem. 24, 1866-1874

BROCKHAUSEN, I., MATTA, K.L., ORR, J., SCHACHTER, H., KOENDERMANN, A.H.L.,  
VAN DEN EIJNDEN, D.H.

(1986) Eur. J. Biochem. 157, 463-474

BROWN, A., FEIZI, T., GOOI, H.C., EMBLETON, M.J., PICARD, J.K., BALDWIN, R.W.

(1983) Biosci. Report. 3, 163-170

BUCK, C.A., FUHRER, J.P., SOSLAU, G., WARREN, L.

(1974) J. Biol. Chem. 249, 1541-1550

CACHE, P., WIERUSZESKI, J.-M, MICHALSKI, J.-C., MONTREUIL, J., STRECKER, G.

(1987) in Glycoconjugates (Montreuil, J., Verbert, A., Spik, G., Fournet, B.,  
eds) Proceedings of the IXth International Symposium Lille, France, A98

CARLSON, D.M., Mc GUIRE, E.J., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S.

(1964) Fed. Proc. 23, 380

CARLSSON, S.R., SASAKI, H., FUKUDA, M.

(1986) J. Biol. Chem. 261, 12787-12795

CARNE, L.R., WATKINS, W.M.

(1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 700-707

CARTRON, J.-P., BLANCHARD, D.

(1982) Biochem. J. 207, 497-504

CARTRON, J.-P., KORNPORST, M., LEMONNIER, M., LAMBIN, P., PILLER, F., SALMON, C.

(1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 331-337

CARTRON, J.-P., ROUGER, P., SALMON, C.

(1983) Glycoconjugués de la membrane érythrocytaire et leurs marqueurs génétiques. Librairie Arnette, Paris

CAZAL, P., MONIS, M., GAUBEL, J., BRIVES, J.

(1968) Rev. Fr. Trans. 11, 209-221

CAZAL, P., MONIS, M., BIZOT, M.

(1971a) Rev. Fr. Trans. 14, 321-333

CAZAL, P., MONIS, M., BIZOT, M.

(1971b) Nouv. Rev. Franç. Hemat. 11, 909-912

CHANDRASEKARAN, E.V., DAVILA, M., NIXON, D.W., GOLDFARB, M., MEDICINO, J.F.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 7213-7222

CHENG, P.W., WINGERT, W.E., LITTLE, M.R., WEI, R.

(1985) Biochem. J. 227, 405-412

CHILDS, R.A., FEIZI, T., TONEGAWA, Y.

(1979) Biochem. J. 181, 533-538

CHILDS, R.A., PENNINGTON, J., UEMURA, K., SCUDDER, P., GOODFELLOW, P.N., EVANS, M.J., FEIZI, T.

(1983) Biochem. J. 215, 491-503

CHILDS, R.A., BERGER, E.G., THORPE, S.J., REGERTER, E., FEIZI, T.

(1986) Biochem. J. 238, 605-611

CONZELMANN, A., KORNFELD, S.

(1984a) J. Biol. Chem. 259, 12528-12535

CONZELMANN, A., KORNFELD, S.

(1984b) J. Biol. Chem. 259, 12536-12542



CUMMINGS, R.D., KORNFIELD, S., SCHNEIDER, W.J., HOBGOOD, K.K., TOLLESHAUG, H.,  
BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 15261-15273

DAHR, W., UHLENBRUCK, G., JANSSEN, E., SCHMALISCH, R.

(1976) Blut 32, 171-184

DAHR, W.

(1981) Rev. Franç. Transf. Immunohematol. 24, 85-95

DELANNOY, P., DEBRAY, H., MONTREUIL, J.

(1985) C. R. Acad. Sc. Paris 301, 767-771

DESCHUYTENEER, M., ECKHARDT, A.E., ROTH, J., HILL, R.L.

(1988) J. Biol. Chem. 263, 2452-2459

DONALD, A.S.R., SOH, C.P.C., WATKINS, W.M., MORGAN, W.T.J.

(1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 58-65

DONALD, A.S.R., YATES, A.D., SOH, C.P.C., MORGAN, W.T.J., WATKINS, W.M.

(1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 625-631

DONALD, A.S.R., YATES, A.D., SOH, C.P.C., MORGAN, W.T.J., WATKINS, W.M.

(1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 596-599

DONALD, A.S.R., FEENEY, J.

(1986) Biochem. J. 236, 821-828

DONALD, A.S.R., SOH, C.P.C., YATES, A.D., FEENEY, J., MORGAN, W.T.J.,  
WATKINS, W.M.

(1987) Biochem. Soc. Trans. 15, 606-608

ELHAMMER, A., KORNFIELD, S.

(1984) J. Biol. Chem. 99, 327-331

FEIZI, T., CHILDS, R.A.

(1987) Biochem. J. 245, 1-11

FEIZI, T.

(1981) Trends Biochem. Sci. 6, 333-335

FEIZI, T.

(1983) Biochem. Soc. Trans. 11, 263-265

FEIZI, T.

(1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 545-549

FEIZI, T., GOOI, H.C., CHILDS, R.A., PICARD, J.K., UEMURA, K., LOOMES, L.M.,  
THORPE, S.J., Hounsell, E.F.

(1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 591-596

FEIZI, T.

(1985) Nature 314, 53-57

FINNE, J.

(1975) Biochem. Biophys. Acta 412, 317

FINNE, J.

(1980) Eur. J. Biochem. 104, 181-189 FINNE, J.

(1984) Trends Biochem. Sci. 9, 129-132

FLETCHER, A.P.

(1972) in Glycoproteins (Gottschalk, A., ed.) 892-908, Elsevier, Amsterdam

FORSTER, C.S., EDWARDS, P.A., DINSDALE, E.A., NEVILLE, A.M.

(1982) Virchows Arch. 394, 279-293

FOX, N., DAMJANOV, J., KNOWLES, B.B., SOLTER, D.

(1983) Cancer Res. 43, 669-678

FRASER, D., CLAMP, J. R.

(1979) Clin. Chim. Acta 59, 301-307

FUKUDA, M., SPOONER, E., OATES, J.E., DELL, A., KLOCK, J.C.

(1984) J. Biol. Chem. 259, 10925-10935

FUKUDA, M.

(1985) *Biochim. Biophys. Acta* 780, 119-150

FUKUDA, M.N., DELL, A., OATES, J.E., FUKUDA, M.

(1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6623-6631

FURTHMAYER, H., TOMITA, M., MARCHESI, V.T.

(1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 113-121

GAHMBERG, C.G.

(1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 81-95

GAHMBERG, C.G., JOKINEN, M., KARHI, K.K., ULMANEN, I., KAARIAINEN, L.,  
ANDERSSON, L.C.

(1981) *Rev. Franç. Trans. Immuno-hematol.* 24, 53-63

GAHMBERG, C.G., EKBLÖM, M., ANDERSSON, L.C.

(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6752-6756

GERBAL, A., LOPEZ, M., CHASSAIGNE, M., GENETET, B., SELVA, J., YVART, J.,  
SALMON, C.

(1976a) *Rev. Franç. Transf. et Immunohématol.* 19, 415-429

GERBAL, A., LOPEZ, M., MASLET, C., SALMON, C.

(1976b) *Haematologia* 10, 383-391

GLICK, M.C., SANTER, U.

(1978) *In Cell Surface Carbohydrate Chemistry*, HARMON R.E., 13-26

GOOI, H.C., FEIZI, T., KAPADIA, A., KNOWLES, B.B., SOLTER, D., EVANS, M.J.

(1981) *Nature* 292, 156-158

GOOI, H.C., WILLIAMS, L.K., UEMURA, K., HOUNSELL, E.F., Mc ILHINNEY, R.A.J.,  
FEIZI, T.

(1983) *Mol. Immunol.* 30, 607-613

GOTTSCHALK, A.

(1972) *Glycoproteins*, 2nd Edn. Vols 1 and 2, Elsevier, Amsterdam

HAFFAR, O.K., EDWARDS, C.P., FIRESTONE, G.L.

(1986) *Biochim. Biophys. Acta* 884, 520-530

HAGOPIAN, A., EYLAR, E.H.

(1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 422-433

HAKOMORI, S.I., STRYCHARZ, G.D.

(1968) *Biochemistry* 7, 1279

HAKOMORI, S.I., MURAKAMI, W.T.

(1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59, 254-261

HAKOMORI, S.I.

(1975) *Biochim. Biophys. Acta* 417, 55-89

HAKOMORI, S.I.

(1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50, 733-764

HAKOMORI, S.I., NUDELMAN, E., LEVERY, S., SOLTER, D., KNOWLES, B.B.

(1981) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100, 1578-1586

HAKOMORI, S.I.

(1983a) *Biochem. Soc. Trans.* 11, 268-269

HAKOMORI, S.I.

(1983b) *Bull. Cancer* 70, 118-126

HAKOMORI, S.I.

(1985) *Cancer Res.* 45, 2405-2414

HANFLAND, P.

(1975) *Chem. Phys. Lip.* 15, 105-124

HANISH, F.-G., UHLENBRUCK, G., DIENST, C.

(1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 467-474

HANISH, F.-G., EGGE, H., PETER-KATALINIC, J., UHLENBRUCK, G., DIENST, C.,  
FANGMANN, R.

(1985) *Eur. J. Biochem.* 152, 343-351

HANOVER, J.A., LENNARZ, W.J., YOUNG, J.D.

(1980) J. Biol. Chem. 255, 6713-6716

HANOVER, J.A., ELTING, S., MINTZ, G.R., LENNARZ, W.J.

(1982) J. Biol. Chem. 257, 10172-10177

HANSSON, G.C., KARLSSON, K.A., LARSON, G., Mc KIBBIN, J.M., BLASZCZYK, M.  
HERLYN, M., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 4091-4097

HANSSON, G. C., ZOPF, D.

(1985) J. Biol. Chem. 260, 9388-9392

HEARN, Y.M., GOODWIN, S.D., WATKINS, W.M.

(1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1279

HERKT, F., PAZ PARENTE, J., LEROY, Y., FOURNET, B., BLANCHARD, D., CARTRON,  
J.-P., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G.

(1985) Eur. J. Biochem. 146, 125-129

HERLANT-PEERS, M.C., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., VAN HALBEEK,  
H., VELDINK, G.A., Vliegenthart J.F.G.

(1981) Eur. J. Biochem. 117, 291-300

HILL, H.D., SCHWYZER, M., STEINMAN, H.M., HILL, R.L.

(1977) J. Biol. Chem. 252, 3799-3804

HIRABAYASHI, T., TAKI, T., MATSUMOTO, M., KOJIMA, K.

(1978) Biochem. Biophys. Acta 529, 96-105

HIROTA, M., FUKUSHIMA, K., TERASHITA, G.Y., KAWAMARA, M., CHIA, D., SUYAMA,  
N., TOGASHI, H.

(1985a) Cancer Res. 45, 1901-1905

HIROTA, M., FUKUSHIMA, K., TERASAKI, P.I., TERASHITA, G.Y., GALTON, J.,  
KAWAHARA, M.

(1985b) Cancer Res. 45, 6453-6456

- HOROWITZ, M.I.  
(1982) The glycoconjugates, Vol. III, part A, Academic Press, London
- HOUNSELL, E.F., FEIZI, T.  
(1982) Med. Biol. 60, 227-236
- HOUNSELL, E.F., LAWSON, A.M., FEENEY, J., GOOI, H.C., PICKERING, N.J., STOLL, M.S., LUI, S.C., FEIZI, T.  
(1985) Eur. J. Biochem. 148, 367-377
- HUGHES, R.C.  
(1983) Glycoproteins. Chapman and Hall, London
- IVATT, R.J.  
(1984) The Biology of Glycoproteins, Plenum Press, New York
- JOHNSON, D.C., SPEAR, P.G.  
(1983) Cell 32, 987-997
- JOHNSON, P.H., YATES, A.D., WATKINS, W.M.  
(1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 1611-1618
- JOKINEN, M., ANDERSSON, L.C., GAHMBERG, C.G.  
(1985) J. Biol. Chem. 260, 11314-11321
- KABAT, E.A., LIAO, J., SHYONG, J., OSSERMAN, E.F.  
(1982) J. Immunol. 128, 540-544
- KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J., Vliegenthart, J.F.G., CLAMP, J.R.  
(1975) Biochem. J. 151, 491-495
- KANNAGI, R., NUDELMAN, E., LEVERY, S.B., HAKOMORI, S.I.  
(1982) J. Biol. Chem. 257, 14865-14874
- KEENAN, T.W., HUANG, C.M., MORRE, D.J.  
(1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1277-1283

KEENAN, T.W., MORRE, D.J.

(1973) Science 182, 935-937

KIM, Y.S., PERDOMO, J., NORBERG, J.

(1971) J. Biol. Chem. 246, 5466-5476

KINSELLA, R.A., FRANCIS, F.E.

(1971) J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 801-818

KLEIN, A., LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., ROUSSEL, P., BREG, J., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G.

(1988) Eur. J. Biochem. 171, 631-642

KLENK, H.D., CHOPPIN, P.W.

(1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 57-64

KO, G.K.W., RAGHUPATHY, E.

(1972) Biochim. Biophys. Acta 264, 129-143

KOHLER, G., MILSTEIN, C.

(1975) Nature 256, 495-497

KORNFELD, R., KORNFELD, S.

(1980) in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (Lennarz, W.J., ed.) pp.1-34, Plenum Press, New York

KOSCIELAK, J., PIASEK, A., GORNIAK, H., GARDAS, A., GREGOR, A.

(1973) Eur. J. Biochem. 37, 214-225

KOSCIELAK, J., ZDEBSKA, E., WILCZYNSKA, Z., MILLER-PODRAZA, H., DZIERZKOWA-BORODEJ, W.

(1979) Eur. J. Biochem. 96, 331-337

KOSCIELAK, J.

(1986) Glycoconjugate J. 3, 95-108

KRUSIUS, T., FINNE, J., RAUVALA, H.  
(1978) Eur. J. Biochem. 92, 289-300

KUMAZAKI, T., YOSHIDA, A.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4193-4197

KUROSAKA, A., NAKAJIMA, H., FUNAKOSHI, I., MATSUYAMA, M., NAGAYO, T.,  
YAMASHINA, I.  
(1983) J. Biol. Chem. 258, 11594-11598

LAEMMLI, U.K.  
(1970) Nature (London) 227, 680-685

LEDGER, P.W., TANZER, M.L.  
(1984) Trends Biochem. Sci. 9, 313-314

LEE, W.M., WESTRICK, M.A., MACHER, B.A.  
(1982) J. Biol. Chem. 257, 10090-10095

LEHRS, H.  
(1930) Z. Immun. Forsch. 66, 175

LE PENDU, J., LEMIEUX, R.U., DALIO, A.M., LAMBERT, F., ORIOL, R.  
(1983) Vox Sang. 45, 349-358

LE PENDU, J., CARTRON, J.-P., LEMIEUX, R.U., ORIOL, R.  
(1985) Am. J. Hum. Genet. 37, 749-760

LEWIS, M., KAITA, H., CHOWN, B., TIPPETT, P., GAVIN, J., SANGER, R.,  
GIBLETT, E., STEINBERG, A.G.  
(1973) Vox Sang. 25, 336-340

LISOWSKA, E., WASNIEWSKA, K.  
(1978) Eur. J. Biochem. 88, 247-252

LISOWSKA, E., DUK, M., DAHR, W.  
(1980) Carbohydr. Res. 79, 103-113



LISOWSKA, E.

(1981) Rev. Franç. Transf. Immunohematol. 24, 75-84

LOHMANDER, L.S., HASCALL, V.C., YANAGISHITA, M.L., KUETTNER, K.E.,  
KIMURA, J.H.

(1986) Arch. Biochem. Biophys. 250, 211-227

LOOMES, L.M., UEMURA, K., CHILDS, R.A., PAULSON, J.C., ROGERS, G.N., SCUDDER,  
P.R., MICHALSKI, J., HOUNSELL, E.F., TAYLOR-ROBINSON, D., FEIZI, T.

(1984) Nature 307, 560-563

LOPEZ, M., GERBAL, A., BONY, V., SALMON, C.

(1975) Vox Sang. 28, 305-313

Mc GUIRE, ROSEMAN, S.

(1967) J. Biol. Chem. 242, 3745-3755

MACVIE, S.I., MORTON, J.A., PICKLES, M.M.

(1967) Vox Sang. 13, 485-492

MAGNANI, J.L., BROCKHAUS, M., SMITH, D.F.

(1981) Science 212, 55-56

MAGNANI, J.L., NILSSON, B., BROCKHAUS, M., ZOPF, D., STEPLEWSKI, Z.,  
KOPROWSKI, H., GINSBURG, V.

(1982) J. Biol. Chem. 257, 14365-14369

MAGNANI, J.L.

(1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 543-545

MAGNANI, J.L., BALL, E.D., FANGER, M.W., HAKOMORI, S.I., GINSBURG, V.

(1984) Arch. Biochem. Biophys. 223, 501-504

MARCHESI, V.T., TILLACK, T.W., JAKSON, R.L., SEGREST, J.P., SCOTT, R.E.

(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1445-1449

MARSCH, W.L.

(1961) Brit. J. Haematol. 7, 200-209

MARSCH, M.

(1984) *Biochem. J.* 218, 1-10

MARTIN, G.R.

(1980) *Science* 209, 768-776

MEHMET, H., SCUDDER, P., TANG, P.W., HOUNSELL, E.F., CATERSON, B., FEIZI, T.

(1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 385-391

MIZOGUSHI, A., TAKASAKI, S., MAEDA, S., KOBATA, A.

(1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11949-11957

MONTREUIL, J.

(1982) *Comp. Biochem.* 19B/II, 1-188

MONTREUIL, J., DEBRAY, H., DEBEIRE, P., DELANNOY, P.

(1983) in H. Popper, W. REUTTER, F. GUDAT and E. KÖTTGEN (eds) *Falk Symposium 34 on Structural Carbohydrates in the Liver* pp 239-258, M.T.P. Press Lancaster

MONTREUIL, J.

(1984) *Biol. Cell* 51, 115-132

MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., DEBRAY, H., FOURNET, B., SPIK, G., STRECKER, G.

(1986) in *Carbohydrate Analysis, a practical approach*, Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. eds, IRL Press Oxford, 143-204

MOORE, B.P.L., MARSH, S.

(1975) *Transfusion* 15, 132-134

MORELL, P., BRAUN, P.

(1972) *J. Lip. Res.* 13, 293-310

MORGAN, W.T.J., SOH, C., WATKINS, W.M.

(1979) *Glycoconjugates* (Eds. R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M.F. Kramer, J.F.G. Vliegenthart and H. Wiegandt) pp 582-583, Thieme, Stuttgart

MORTON, J.A., PICKLES, M.M., TERRY, A.M.

(1970) *Vox Sang* 19, 472-482

MURAMATSU, H., MURAMATSU, T.

(1983) FEBS Lett. 163, 181-184

NIEMANN, H., WATANABE, K., HAKOMORI, S., CHILDS, R.A., FEIZI, T.

(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1286-1293

NIEMANN, H., BOSCHEK, D., EVANS, M., ROSING, T., KLENK, H.D.

(1982) EMBO J. 1, 1499-1504

NISHIMURA, K., SATO, E., NAKAMURA, A.

(1987) J. Biochem. 101, 1315-1318

NUDELMAN, E., HAKOMORI, S.I., KANNAGI, R., LEVERY, S., YEH, M.Y., HELLSTROM, K.E., HELLSTROM, I.

(1982) J. Biol. Chem. 257, 12752-12756

NUWAYHID, N., GLASER, J.H., JOHNSON, J.C., CONRAD, H.E., HAUSER, S.C., HIRSCHBERG, C.B.

(1986) J. Biol. Chem. 261, 12936-12941

OGATA, S.I., MURAMATSU, T., KOBATA, A.

(1979) Nature 259, 580-582

OLDING, L.B., THURIN, J., SVALANDER, C., KOPROWSKI, H.

(1984) Int. J. Cancer 34, 187-192

ORIOLO, R., DANILOVS, J., HAWKINS, B.R.

(1981) Am. J. Hum. Genet. 33, 421-431

ORIOLO, R., LE PENDU, J., MOLLICONE, R.

(1986) Vox Sang. 51, 161-171

PALLADE, G.E.

(1975) Science 189, 347-358

PATZELT, C., WEBER, B.

(1986) EMBO J. 5, 2103-2108

PEREIRA, M.E.A., KABAT, E.A., LOTAN, R., SHARON, N.

(1976) Carbohydr. Res. 51, 107-118

PICARD, J.K., WALDRON-EDWARD, D., FEIZI, T.

(1978) J. Clin. Lab. Immunol. 1, 119-128

PICARD, J.K., FEIZI, T.

(1983) Mol. Immunol. 20, 1215-1220

PICARD, J.K., FEIZI, T.

(1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 653-655

PICKLES, M.M., MORTON, J.A.

(1977) in CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science (Seligson, ed.)  
pp. 277-286, CRC Press, Inc., Cleveland

PILLER, F., CARTRON, J.-P.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 12293-12299

PILLER, F., CARTRON, J.-P., MARANDUBA, A., VEYRIERES, A., LEROY, Y.,  
FOURNET, B.

(1984) J. Biol. Chem. 259, 13385-13390

PILLER, F., BLANCHARD, D., HUET, M., CARTRON, J.-P.

(1986) Carbohydr. Res. 149, 171-184

PODOLSKY, D.K.

(1985) J. Biol. Chem. 29, 15510-15515

PRESPER, K.A., BASU, M., BASU, S.

(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 289-293

PROHASKA, R., KOERNER, T.A.W., ARMITAGE, I.A., FURTHMAYR, H.

(1981) J. Biol. Chem. 256, 5781

PUKEL, C.S., LLOYD, K.O., TRAVASSOS, L.R., DIPPOLD, W.G., OETTGEN, H.F., OLD,  
L.J.

(1982) J. Exp. Med. 155, 1133-1147

RACE, R.R., SANGER, R.

(1975a) Blood Groups in Man, 6th edition, Blackwell Scientific Publications Oxford, pp 287-300

RACE, R.R., SANGER, R.

(1975b) Blood Groups in Man, 6th edition, Blackwell Scientific Publications Oxford, pp 418-430

RACE, R.R., SANGER, R.

(1975c) Blood Groups in Man, 6th edition, Blackwell Scientific Publications Oxford, pp 395-405

RENTON, P.H., HOWELL, P., IKIN, E., GILES, C., GOLDSMITH, K.L.G.

(1967) Vox Sang. 13, 493-501

ROTH, J.

(1984) J. Cell Biol. 98, 399-406

ROTH, J., LENTZE, M.J., BERGER, E.

(1985) J. Cell Biol. 100, 118-125

ROTH, J., TAATJES, D.J., WEINSTEIN, J., PAULSON, J.C., GREENWELL, P., WATKINS, W.M.

(1986) J. Biol. Chem. 261, 14307-14312

ROTH, J.

(1987) Biochim, Biophys. Acta 906, 405-436

RUMPOLD, H., OBEXERAND, G., KRAFT, D.

(1982) in "NK cells and other natural effector cells" (Herbermann, R.B. ed.) pp 47-52, Academic Press, New York.

SADLER, J.E.

(1984) in Biology of Carbohydrates, Ginsburg V. and Robbins P.W. ed, Wiley interscience Publication, vol. 2, pp. 199-288

SANGER, R., GAVIN, J., TIPPETT, P., TEESDALE, P., ELDON, K.

(1971) Lancet, i, 1130

SANTER, U.V., GLICK, M.C., VAN HALBEEK, H., VLIEGENTHART, J.F.G.  
(1983) Carbohydr. Res. 120, 197-217

SANTER, U.V., GILBERT, F., GLICK, M.C.  
(1984) Cancer Res. 44, 3730-3735

SCHACHTER, H., Mc GUIRE, E., ROSEMAN, S.  
(1971) J. Biol. Chem. 246, 5321-5328

SCHACHTER, H.  
(1978) in The Glycoconjugates (Pignon, W. and Horowitz, M. Eds.) vol. II,  
pp. 87-181, Acad. Press, Orlando, FL

SERAFINI-CESSI, F., DALL'OLIO F.  
(1982) In Lectins : Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (Bog-Hansen,  
T.C., ed.) vol.2, pp.367-379, Walter de Gruyter, New York

SERAFINI-CESSI, F., DALL'OLIO, F.  
(1983) Biochem. J. 215, 483-489

SIDDIQUI, B., WHITHEHEAD, J.S., KIM, Y.S.  
(1978) J. Biol. Chem. 253, 2168-2175

SJOGREN, H.O., HELLSTROM, I., BANSAL, S.C., WARNER, G.A., HELLSTROM, G.  
(1972) Int. J. Cancer 9, 274-283

SLOMIANY, B.L., MURTY, V.L.N., SLOMIANY, A.  
(1980) J. Biol. Chem. 255, 9719-9723

SLOMIANY, B.L., ZDEBSKA, E., SLOMIANY, A.  
(1984) J. Biol. Chem. 259, 2863-2869

SMITH, C.A.  
(1959) in The Physiology of the newborn infant, 3e ed., pp. 235-250,  
Blackwell Scientific Publications, Oxford.

SOH, C.P.C., MORGAN, W.T.J., WATKINS, W.M., DONALD, A.S.R.  
(1980) Biochem. Biophys. Res. Commun 93, 1132-1139

SOLTER, D., KNOWLES, B.B.

(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5565-5569

SOULIER, S., GAYE, P.

(1981) Biochimie 63, 619-628

SPIELMAN, J., HULL, S.R., SHENG, Z., KANTERMAN, R., BRIGHT, A., CARRAWAY, K.L.

(1988) J. Biol. Chem. 263, 9621-9629

SPOONCER, E., FUKUDA, M., KLOCK, J.C., OATES, J.E., DELL, A.

(1984) J. Biol. Chem. 259, 4792-4801

SRINGARM, S., CHUPUNGART, C., GILES, C.M.

(1972) Vox Sang. 23, 537-545

SRINGARM, S., CHIEWSLILP, P., TUBROD, J.

(1974) J. Biol. Chem. 250, 6727-6734

SPRINGER, G.F., DESAI, P.R.

(1975) Carbohydr. Res. 40, 183

STROUS, G.J.A.M.

(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2695-2698

STROUS, G.J.A.M., WILLEMSSEN, R., VAN KERKHOF, P., SLOT, J.W., GEUZE, H.J., LODISH, H.F.

(1983) J. Cell Biol. 97, 1815-1822

STROUS, G.J., BERGER, E.G.

(1985) in Glycoconjugates : Proceedings of the 8th International Symposium on Glycoconjugates; Houston, Texas, September 8-13, 1985 (Davidson, E.A., Williams, J.C. and diFerrante, N.M., eds.) pp 505-506, Praeger, New York

SUZUKI, Y., NAGAO, Y., KATO, H., MATSUMOTO, M., NEROME, K., NAKAJIMA, K., NOBUSAWA, E.

(1986) J. Biol. Chem. 261, 17057-17061

TAGASAKI, S., IKEHIRA, H., KOBATA, A.

(1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 735-742

TAMM, I., HORSFALL, L.F.

(1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 108-114

TANG, P.W., SCUDDER, P., HEMMET, H., HOUNSELL, E.F., FEIZI, T.

(1986) Eur. J. Biochem. 160, 537-545

TARTAKOFF, A.M.

(1983) Cell 32, 1026-1028

TARTAKOFF, A.M., VASSALLI, P.

(1977) J. Exp. Med. 146, 1332-1345

TETTEROO, P.A.T., MULDER, A., LANSDORP, P.M., ZOLA, H., BAKER, D.A., VISSER, F.J., VON DEM BORNE, A.E.G.Kr.

(1984) Eur. J. Immunol. 14, 1089-1095

THOMAS, D.B., WINZLER, R.

(1969) J. Biol. Chem. 21, 5943-5946

THONAR, E.J.-M.A., LOHMANDER, L.S., KIMURA, J.H., FELLINI, S.A., YANAGISHITA, M., HASCALL, V.C.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 11564-11570

TOMITA, M., MARCHESI, V.T.

(1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2964-2968

TOMITA, M., FURTHMAYER, H., MARCHESI, V.T.

(1978) Biochemistry 17, 4756-4770

UCHIDA, N., SMILOWITZ, H., LEDGER, P.W., TANZER, M.L.

(1980) J. Biol. Chem. 255, 8638-8644

UHLENBRUCK, G., SPRENGER, I., HEGGEN, M., LESENEY, A.M.

(1971) Z. Immun. Forsch. 141, 290-291

URDAL, D.L., BRETNALL, T.A., BERNSTEIN, I.D., HAKOMORI, S.I.

(1983) Blood 62, 1022-1026

VAN DEN EIJNDEN, D.H., WINTERWEP, H., SMEEMAN, P., SCHIPHORST, W.E.C.M.

(1983) J. Biol. Chem. 258, 3435-3437



WARREN, L., FUHRER, J.P., BUCK, C.A.

(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1838-1842

WARREN, L., FUHRER, J.P., BUCK, C.A.

(1973) Fed. Proc. 32, 80-85

WARREN, L., BUCK, C.A., TUCZINSKI, G.P.

(1978) Biochem. Biophys. Acta 516, 91-127

WATANABE, K., MATSUBARA, T., HAKOMORI, S.I.

(1976) J. Biol. Chem. 251, 2385-2387

WATKINS, W.M.

(1966) Science 152, 172-181

WATKINS, W.M.

(1979) Rev. Franç. Transf. Immunohematol. 22, 35-57

WATKINS, W.M.

(1980) Adv. Human Genetics 10, 1-136 et 379-385

WESTERVELD, A., NAYLOR, S.

(1984) Cytogenet. Cell Genet. 37, 156-159

WIEGANDT, H.

(1971) Advance in lipid research 9, 249-289

WIERUSZESKI, J.M., MICHALSKI, J.C., MONTREUIL, J., STRECKER, G.,  
PETER-KATALINIC, J., EGGE, H., VAN HALBEEK, H., MUTSAERS, J.H.G.M.,  
VLIEGENTHART, J.F.G.

(1987) J. Biol. Chem. 262, 6650-6657

WILLIAMS, D., SCHACHTER, H.

(1980) J. Biol. Chem. 255, 11247-11252

WILLIAMS, D., LONGMORE, G., MATTA, K.L., SCHACHTER, H.

(1980) J. Biol. Chem. 255, 11253-11261

- WILLIAMS, L.K., SULLIVAN, A., Mc ILHINNEY, R.A., NEVILLE, A.M.  
(1982) Int. J. Cancer 30, 731-738
- WILLIAMS, J., MARSHALL, R.D., VAN HALBEEK, H., VLIEGENTHART, J.F.G.  
(1984) Carbohydr. Res. 134, 141-155
- WINGERT, W.E., CHENG, P.W.  
(1984) Biochemistry 23, 690-697
- YAMASHITA, T., MURAYAMA, J.I., UTSUHI, H., HAMADA, A.  
(1985) Biochim. Bioph. Acta. 839, 26-31
- YANG H.-J., HAKOMORI, S.I.  
(1971) J. Biol. Chem. 246, 1192-1200
- YATES, A.D., WATKINS, W.M.  
(1983) Carbohydr. Res. 120, 251-268
- YAZAWA, S., ABBAS, S.A., MADIYALAKAN, R., BARLOW, J.J., MATTA, K.L.  
(1986) Carbohydr. Res 149, 241-252
- YOSHIMA, H., FURTHMAYER, K., KOBATA, A.  
(1980) J. Biol. Chem. 256, 9713-9718
- YOUNG, D.M., SCHWERT, G.W., HARRIS, J.S.  
(1958) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 673-675
- ZDEBSKA, E., MAGNUSKA, A., KUSNIERZ, G., SEYFRIED, H., KOSCIELAK, J.  
(1980) FEBS Lett. 120, 33-36
- ZDEBSKA, E., KRAUZE, R., KOSCIELAK, J.  
(1983) Carbohydr. Res. 120, 113-130
- ZIELENSKI, J., KOSCIELAK, J.  
(1983a) FEBS Lett 158, 164-169
- ZIELENSKI, J., KOSCIELAK, J.  
(1983b) FEBS Lett. 163, 114-118

ZINN, A.B., PLANTNER, J.J., CARLSON, D.M.

(1977) in The Glycoconjugates (Horowitz, M.I. and Pigman, W., eds.), vol 1,  
pp. 69-85, Academic Press, New York

