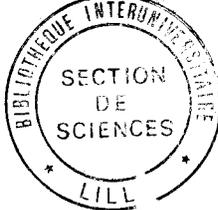


50376
1989
15



Numéro d'ordre : 312

50376
1989
15

UNIVERSITE DES SCIENCES, TECHNIQUES ET ARTS DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

par

Haris CAZLARIS

MODIFICATION DES ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

DE CELLULES BHK 21/C13 ET NIH 3T3 TRANSFORMEES *IN VITRO*

PAR L'ONCOGENE HUMAIN *c-Ha-ras*.

CORRELATION AVEC LE POTENTIEL METASTATIQUE DE CES CELLULES *IN VIVO*.

Soutenue le 30 janvier 1989 devant la Commission d'examen

Président : Professeur J. Montreuil
Rapporteurs : Professeur P. Roussel
Professeur A. Verbert
Examineurs : Professeur D. Stéhelin
Docteur G. Strecker

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au C.N.R.S. n° 217; Directeur: Pr J. Montreuil), sous la direction du Professeur Jean Montreuil et dans le Service d'Oncologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Lille (Unité mixte I.N.S.E.R.M. U186 / C.N.R.S. URA 156; Directeur: Pr D. Stéhelin), sous la direction du Docteur Simon Saule.

Nous sommes tous des additionnés...

"Pseudo", Ajar

Maintenant, on a le temps... tout le temps qui a le temps de prendre son temps.

C.H.

A mes parents

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	p. 5
ABREVIATIONS.....	p. 8
INTRODUCTION.....	p. 9
CHAPITRE I : GENERALITES.....	p. 11
A. <u>CANCER, METASTASE ET TRANSFORMATION CELLULAIRE</u>	p. 13
1. <u>Historique</u>	p. 13
2. <u>Définitions</u>	p. 15
B. <u>ONCOGENES</u>	p. 17
1. <u>Définitions</u>	p. 17
2. <u>Stratégie d'isolement</u>	p. 19
3. <u>Rôles des oncogènes</u>	p. 19
C. <u>GLYCOCONJUGUES CELLULAIRES</u>	p. 24
1. <u>Définitions et remarques générales</u>	p. 24
2. <u>Les glycolipides</u>	p. 25
3. <u>Les glycoprotéines</u>	p. 25
a. <u>Les O-glycosylprotéines</u>	p. 29
b. <u>Les N-glycosylprotéines</u>	p. 31
4. <u>Lectines</u>	p. 34
5. <u>Conclusion</u>	p. 34
D. <u>"SURFACE CELLULAIRE" SIEGE D'INTERACTIONS</u>	p. 35
1. <u>Remarques générales</u>	p. 35
2. <u>La membrane cellulaire</u>	p. 35
3. <u>Matrice extracellulaire et cytosquelette</u>	p. 37
4. <u>Angiogenèse</u>	p. 39
5. <u>Transduction de signaux</u>	p. 42

E. <u>LE PHENOTYPE MALIN</u>	p. 43
1. <u>Marqueurs tumoraux de nature oligosaccharidique</u>	p. 43
a. <u>Les antigènes oncofœtaux</u>	p. 43
b. <u>Multi-antennarisation des glycanes</u>	p. 43
c. <u>Acides sialiques</u>	p. 45
d. <u>Fucose périphérique et osamine intercalaire</u>	p. 45
e. <u>Autres marqueurs - Conclusion</u>	p. 45
2. <u>Développement du phénotype malin <i>in vivo</i></u>	p. 46
a. <u>Etapes de la métastase</u>	p. 46
b. <u>Surveillance immune</u>	p. 46
c. <u>Conclusion</u>	p. 47
F. <u>STRATEGIE DE RECHERCHES - CONCLUSION</u>	p. 47
1. <u>Approches thérapeutiques</u>	p. 47
2. <u>Modèles expérimentaux</u>	p. 48
a. <u>Modèle BHK - BHK/HSV</u>	p. 48
b. <u>Le carcinome pulmonaire de Lewis</u>	p. 49
c. <u>Le modèle des cellules uroépithéliales humaines</u>	p. 49
d. <u>Nouveau modèle</u>	p. 49
3. <u>Choix de l'oncogène <i>ras</i></u>	p. 50
4. <u>Choix de la méthode de transformation</u>	p. 52
5. <u>Choix de modèles animaux</u>	p. 52
6. <u>Méthodologie biochimique</u>	p. 53
7. <u>Conclusion</u>	p. 53
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	p. 55
A. <u>MILIEUX ET SOLUTIONS POUR LA CULTURE CELLULAIRE</u>	p. 57
1. <u>Milieu D 10 FCS</u>	p. 57
2. <u>Solution VT (Versène-Trypsine)</u>	p. 57
3. <u>Milieu de congélation</u>	p. 57
B. <u>SOLUTIONS-TAMPONS POUR LA CHROMATOGRAPHIE</u>	p. 57
1. <u>Tampons destinés à la chromatographie d'affinité sur ConA immobilisée</u>	p. 57
2. <u>Tampon PBS</u>	p. 58
3. <u>Tampon AcA</u>	p. 58
C. <u>ANIMAUX</u>	p. 58

D. <u>CULTURE DE CELLULES</u>	p. 59
1. <u>Mise en culture d'une souche congelée</u>	p. 59
2. <u>Mise en culture à partir de biopsies</u>	p. 59
3. <u>Entretien d'une souche</u>	p. 59
4. <u>Clonage cellulaire en milieu semi-solide</u>	p. 60
5. <u>Radiomarquage métabolique</u>	p. 60
6. <u>Comptage de cellules</u>	p. 61
7. <u>Congélation d'une souche</u>	p. 61
8. <u>Microscopie et photographie des cultures</u>	p. 61
E. <u>TRANSFECTIONS ET SELECTION DE CLONES</u>	p. 61
F. <u>ANALYSES GENOMIQUES</u>	p. 62
1. <u>Isolement des DNA</u>	p. 62
a. <u>DNA cellulaire</u>	p. 62
b. <u>DNA tumoral</u>	p. 63
2. <u>Digestion des DNA par des enzymes de restriction</u>	p. 63
3. <u>Electrophorèses en gel d'agarose</u>	p. 63
a. <u>Electrophorèse-test</u>	p. 63
b. <u>Electrophorèse analytique</u>	p. 63
c. <u>Electrophorèse préparative</u>	p. 63
4. <u>Préparation des sondes de DNA et radiomarquage par translation de coupure</u>	p. 64
5. <u>Transfert sur nitrocellulose</u>	p. 64
6. <u>Hybridation moléculaire</u>	p. 65
7. <u>Autoradiographie</u>	p. 65
G. <u>PRODUCTION DE CELLULES EN MASSE</u>	p. 66
1. <u>Culture sur flacons et unités double-tray</u>	p. 66
2. <u>Culture sur bouteilles "rollers"</u>	p. 66
3. <u>Culture sur microporteurs Cytodex 1</u>	p. 67
H. <u>PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES MEMBRANAIRES</u>	p. 68
1. <u>Délipidation de petites quantités de cellules</u>	p. 68
2. <u>Délipidation de quantités préparatives</u>	p. 69
3. <u>Hydrolyse pronasique</u>	p. 69
4. <u>β-Elimination préparative</u>	p. 69

I. <u>FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	p. 70
1. <u>Chromatographie de tamisage moléculaire et chromatographie d'affinité</u>	p. 70
2. <u>Hydrazinolyse</u>	p. 71
3. <u>Fractionnement par HPLC d'échange d'anions</u>	p. 71
J. <u>ANALYSES STRUCTURALES DES OLIGOSACCHARIDES</u>	p. 72
1. <u>Chromatographie en phase gazeuse</u>	p. 72
2. <u>Spectroscopie de RMN du proton à 400 MHz</u>	p. 72
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	p. 73
A. <u>OBTENTION DES SOUCHES ET DES CLONES TRANSFORMES</u>	p. 75
1. <u>Cellules BHK et BHK/HSV</u>	p. 75
2. <u>Cellules BHK_{neo} et BHK_{ras}</u>	p. 75
3. <u>Cellules NIH 3T3</u>	p. 76
4. <u>Cellules NIH_{neo} et NIH_{ras}</u>	p. 76
B. <u>ETUDES <i>IN VIVO</i></u>	p. 76
1. <u>Etude du modèle BHK/BHK_{ras} chez la Souris athymique</u>	p. 76
2. <u>Etude du modèle BHK/BHK_{ras} chez le Hamster</u>	p. 78
3. <u>Mise au point de l'étude <i>in vivo</i> du modèle NIH/NIH_{ras} chez la Souris athymique</u>	p. 79
4. <u>Mise en évidence de cellules métastatiques <i>in vivo</i></u>	p. 79
C. <u>ETUDE DE L'ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE</u>	p. 80
- Publication concernant les résultats obtenus dans le système NIH 3T3/NIH _{ras}	p. 81
- Travaux complémentaires et étude équivalente dans le système BHK/BHK _{ras}	p. 96
D. <u>PREPARATION ET FRACTIONNEMENT DE GLYCOPEPTIDES</u>	p. 96
F. <u>ANALYSES STRUCTURALES DES GLYCANNES ET GLYCOPEPTIDES</u>	p. 101
DISCUSSION GENERALE CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	p. 115
BIBLIOGRAPHIE.....	p. 121

AVANT - PROPOS

Ce travail est l'aboutissement d'un long parcours ; il clôture la fin de mes études, menées depuis dix ans dans les Universités lilloises. A ce titre, il est le fruit du labeur de tous ceux, professeurs et amis, qui, par leur présence autour de moi, ont contribué à façonner ma personnalité actuelle, source de cette réalisation.

Je tiens à remercier les enseignants de Biochimie et de Biologie Cellulaire de l'Université qui ont fait de moi le "biochimiste cellulaire" que je suis devenu.

Monsieur le Professeur Jean Montreuil

J'ai longtemps été fasciné par vos qualités de pédagogue et de chercheur que j'ai eu le plaisir et l'honneur de sentir, depuis sept ans, du Cours de Biochimie de 2^e année aux discussions scientifiques de fin de Thèse. Vous m'avez beaucoup appris et montré "les plaisirs de l'enfer qu'est la recherche". Vous m'avez accueilli dans votre propre équipe, faisant ainsi révéler en moi, au fil des années, ce que vous appelez le "tempérament de chercheur". Je vous en remercie ; je n'oublierai pas le "patron" que vous avez été.

Monsieur le Professeur Dominique Stéhelin

J'ai découvert l'ambiance indescriptible de ton laboratoire en tant qu'étudiant de DEA. Je te remercie de m'y avoir accepté comme stagiaire deux ans plus tard, me permettant ainsi de vivre cette ambiance au quotidien, tout en apprenant un peu du savoir-faire de cette équipe exceptionnelle.

Je tiens à te remercier également d'avoir bien voulu faire partie des juges de ce travail... Ce travail, en apparence éloigné de tes activités de recherche, qui se situe pourtant à l'intersection de trois "sciences" : la biologie moléculaire des gènes, la biologie moléculaire des glycoconjugués et la biologie "cellulaire" du cancer. Je suis persuadé que le décroisement des disciplines, que je me suis efforcé de pratiquer au cours de mes études, est d'une importance peut-être plus grande que la modeste contribution apportée par cette thèse à la connaissance scientifique. Ta présence dans ce jury m'encourage dans cette démarche ; je tiens à te remercier précisément pour cela.

Monsieur Henri Debray

Depuis que je t'ai connu comme enseignant, en TP de Licence, je n'ai jamais cessé d'apprendre de toi. Outre la "science" que tu m'as enseigné avec une compétence et une patience rares, tu m'as appris l'amour du travail bien fait et la persévérance dans ce travail, même si _ et surtout lorsque _ la tâche est ingrate ; cela aussi est rare, je n'oublierai pas.

Monsieur le Professeur Philippe Roussel

Je considère votre présence dans ce jury comme un grand honneur. Je garde ce même sentiment de votre présence dans mon jury de DEA ainsi qu'un vif souvenir de vos Cours et Conférences que j'ai eu le plaisir de suivre depuis quelques années. Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de rapporter ce travail, en y imprimant ainsi la marque de qualité de la biochimie lilloise en matière de glycoconjugués.

Monsieur le Professeur André Verbert

André, tu as marqué, à ta manière, mon apprentissage de la biochimie. Je me souviendrai de tes Cours de Licence, de Maîtrise et de DEA que tu as su rendre passionnants. Si, en rapportant ce mémoire, tu y as trouvé des erreurs (voire des... *horreurs*), tu devrais savoir qu'elles y ont été sciemment distillées, "*pour voir si tu suivais*". Merci infiniment.

Monsieur le Docteur Gérard Strecker

Ah, Gérard et ses idées! Je garderai un vif souvenir du plaisir que j'ai eu à travailler avec toi durant ces dernières semaines. Merci d'avoir "épluché" des spectres de RMN parfois incroyablement mauvais et d'avoir su quand-même tirer profit de... "ça". Merci d'avoir participé à ce jury et surtout merci de n'avoir jamais réussi à "faire rentrer" la RMN dans ma tête. Je n'y comprends toujours "rien", **mais!** je t'assure, ce que tu fais est très beau.

Monsieur le Docteur Simon Saule

Une "aventure" a commencé pour moi le jour où tu passais ta Thèse d'Etat. Je n'oublierai jamais ta disponibilité et ta gentillesse à ce moment-là et pendant les mois qui ont suivi. Ton absence au moment où ce travail aboutit me pèse ; souviens-toi, il y a des "manip's" à faire avec les "sucriers" de mon espèce. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Monsieur le Docteur Philippe Delannoy

Philippe, je tiens à dire ici tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec toi. J'ai fait partie du "lot de bleus" qui ont beaucoup appris de tes cours improvisés sur un coin de la "paillasse-café", ainsi que des discussions scientifiques que tu sais tenir avec un rare sérieux et sans arrière-pensée. Ce sont là des qualités que l'on a du mal à trouver réunies chez une même personne. Merci d'avoir accepté que l'on se "creuse les méninges" à deux, à un moment où une inquiétante "panne" s'annonçait pour moi. Dans ce sens, ta contribution à la réussite de ce travail est grande ; je tiens à t'en remercier.

Monsieur Christian Lagrou

Grand-Chef, comment te remercier ? Tu as passé du temps, beaucoup de temps, à t'occuper de moi, de mon apprentissage et de "mes" cellules. Je me souviendrai toujours de ta grimace, le jour de **ma** première contamination ; t'avais l'air si "content" de me voir *enfin* faire partie du "club" et en même temps si préoccupé, comme si c'étaient tes cellules qui se battaient contre les levures. Grand-Merci.

Je tiens encore à remercier :

Catherine Alonso pour les nombreux coups de main... efficaces au bon moment,

Erik Bruyneel *for helpful comments and discussion...*

Myriam Coniez pour la culture des cellules BHK et BHK/HSV,

Jean-Pierre De Cavel (Animalerie de l'IPL) pour sa disponibilité et son coup de main avec les injections, puis avec les photos des "bébêtes" ...,

Michel Monsigny pour ses conseils concernant la culture cellulaire sur les microporteurs,

Gérard Torpier pour m'avoir fourni les microphotographies originales du glycocalyx,

Jean-Michel Wieruszkeski pour son excellent travail de RMN.

Le personnel du "C9" dans son ensemble et notamment Lionel Bovetto (je lui dois quelques précieux mois de travail que ses avisés conseils m'ont permis d'éviter), François Caner, Jocelyne Celen, Bernadette Coddeville, Olivier Delmas dit "p'tit-loup", Jacqueline Dondeyne, Bernard Fournet, Jean Krembel, Yves Leroy, Jean-Claude Michalski, Jeanine Moerman, Yves Plancke, ainsi que Michèle Autexier et Christine Klee au secrétariat.

L'équipe de l'"U186" et en particulier le "marmiton récalcitrant" dénommé Laudet (Vincent, quoi...) ainsi que Philippe Amouyel, Jean Coll, Thierry Dupressoir, Mireille Fauquet, Patrick Martin, Marie-Berthe Raes, l'unique Brigitte Quatannens (BQ ! BQ !!!) pour leur disponibilité à mon égard. Mes remerciements s'adressent aussi au personnel de la laverie pour leur conscience professionnelle et leur sourire. Un grand merci à Nicole Devassine pour son sourire éternel (sauf quand elle "fait la gueule") et son doigté plus que Mac + (et vive le bicarbonnade de sodium !!!).

Enfin, je remercie mes parents qui, par leur soutien moral et financier m'ont permis de mener le navire à bon port...(δεκα χρονια ειναι πολλα!)

Merci à toi, Cathy, pour m'avoir... supporté et épaulé, surtout ces six derniers mois.

ABREVIATIONS

α -MeGlc : 1-méthyl- α -D-glucoopyranoside

Ara : Arabinose

Asn : Asparagine

BHK : Cellules de rein de Hamster nouveau-né (Baby Hamster Kidney)

BHK/HSV : Cellules BHK transformées par le virus HSV

ConA : Concanavaline A, lectine de *Canavalia ensiformis*

DMEM : Milieu de culture de Fagle modifié par Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

D 10 FCS : milieu DMEM additionné de 10 % de FCS

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dpm : désintégrations par minute

DNA : Acide désoxyribonucléique

EDTA : Ethylène-Diamine Tétracétate

FCS : Fetal Calf Serum, sérum de veau fœtal

Fractions FNRC et FNRL : Fractions non-retenues, respectivement sur les colonnes de ConA et de LCA immobilisées ; FEC et FEL : Fractions éluées de ces colonnes, le chiffre indique la molarité de l'agent d'éluion (α -MeGlc)

Fuc : L-Fucose

Gal : D-Galactose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine

Glc : D-Glucose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine

HPLC : High-performance liquid chromatography

HSV : Hamster Sarcoma Virus

Hyp : Hydroxyproline

Hyl : Hydroxylysine

IUB : International Union of Biochemistry

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

LCA : Lectine de la graine de Lentille (*Lens culinaris* agglutinin)

Man : D-Mannose

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique

PBS : Phosphate-Buffered Saline, solution-tampon de phosphate

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSV : Rous Sarcoma Virus

Ser : Sérine

Thr : Thréonine

Tyr : Tyrosine

UV : Ultra-Violet

WGA : Wheat Germ Agglutinin, lectine du germe de Blé

Xyl : Xylose

INTRODUCTION

Les composés glycosylés de la surface cellulaire sont considérés comme des médiateurs de la "vie sociale" de la cellule eucaryote.

Ces composés sont profondément altérés lors de l'apparition du comportement "antisocial" qui caractérise les cellules malignes. En effet, plusieurs études montrent des modifications structurales des glycanes portés par les protéines et les lipides membranaires, ainsi que par les composés de la matrice extracellulaire, lors de la transformation maligne.

La transformation cellulaire spontanée traduit le dérèglement d'un ensemble de mécanismes qu'il semble illusoire d'aborder globalement. En revanche, la transformation expérimentale par "voie" chimique ou virale, fournit des modèles plus aisément accessibles à l'étude biochimique. *A fortiori*, la transformation cellulaire par un seul gène transformant connu, permet de limiter encore le nombre de paramètres impliqués.

Dans ce contexte, les perturbations des systèmes glycosyltransférasiques, détectables par l'expression de structures glycaniques modifiées, peuvent être corrélées à l'expression de l'oncogène responsable de la transformation, la causalité devant être vérifiée par la suite.

Nous avons entrepris un travail de caractérisation des structures glycaniques de cellules BHK 21/C13 et NIH 3T3 transformées *in vitro* par transfection de l'oncogène humain c-Ha-ras EJ. L'introduction du même gène transformant dans deux lignées cellulaires différentes nous permet de tirer des conclusions quant à l'implication directe du produit de ce gène sur des activités glycosyltransférasiques.

Une étude menée en parallèle concernant la glycosylation des cellules BHK transformées par un rétrovirus sarcomatogène du Hamster (cellules BHK/HSV), nous permet de comparer l'effet de la transformation *per se* sur ces mêmes activités enzymatiques.

La tumorigénicité et la capacité métastatique des clones transformés ont été évaluées *in vivo* en système homologue (cellules BHK chez le Hamster et cellules NIH 3T3 chez la Souris) et en système hétérologue (cellules BHK chez la Souris athymique), ce qui nous a permis de mettre en évidence et de comparer l'acquisition de potentialités métastatiques par les cellules transformées.

Nous avons étendu nos travaux sur la glycosylation des clones transformés et métastatiques obtenus, en étudiant les modifications des activités sialyl-transférasiques présentées par ceux-ci. Une partie des résultats obtenus a fait l'objet d'un article soumis à publication.

* Présentation du mémoire

Nous nous sommes efforcé de respecter au maximum la clarté du langage, en évitant, à chaque fois que cela était possible, le jargon de laboratoire et les "franglicismes"... Que le lecteur veuille bien pardonner d'éventuels manquements à cette règle ; ils sont indépendants de notre volonté.

C'est dans le même état d'esprit que nous avons préféré appliquer à la règle les recommandations internationales en vigueur (règles de l'IUB ou de l'IUPAC) pour ce qui est de la nomenclature et des abréviations utilisées. Ainsi, par exemple, l'acide désoxyribonucléique est abrégé "DNA" et non pas "ADN". De même, un résidu de Fuc lié en 1-6 est placé dans les tableaux et figures **au dessus** de la ligne représentant le monosaccharide sur lequel il est lié, et ainsi de suite.

Les citations, présentées dans le texte selon le modèle "(Auteur, année)", sont référencées dans la Bibliographie par ordre alphabétique et sont affectées d'un numéro indiquant la(les) page(s) où elles sont citées dans le mémoire.

CHAPITRE I : GENERALITES



Figure 1 : Le symbole hiéroglyphe de la "tumeur" dans le papyrus Edwin-Smith (Pitot, 1978) .

"In these days of specialization to the point of boredom, the investigator in carcinogenesis can remain a Renaissance person" (Weinstein, 1981)

A. CANCER, METASTASE ET TRANSFORMATION CELLULAIRE

1. Historique

Le terme "**carcinome**" dérive du grec *καρκινος* : crabe. Galien, s'appuyant probablement sur les écrits d'Hippocrate, adopte ce nom pour rappeler la disposition des vaisseaux sanguins entourant une tumeur. Les Egyptiens savaient déjà reconnaître la maladie chez l'Homme et l'avaient décrite sur le plan clinique, comme en témoigne le papyrus Edwin-Smith, datant de 3000 à 2500 av. J.-C. (figure 1). Ils avaient distingué les tumeurs **bénignes**, traitables par cautérisation ("ulcères" du sein), des tumeurs **malignes**, pour lesquelles aucun traitement n'était envisageable : le papyrus Ebers (1500 av. J.-C.) décrit une tumeur sur laquelle "il ne faut pas intervenir", sous peine de la rendre fatale (Bett, 1957).

Des références à cette maladie sont également retrouvées dans les écritures antiques d'origine hébraïque, assyrienne, indienne et chinoise (Florey, 1970). Les bases de la cancérologie humaine semblent donc posées depuis 5 à 6 millénaires. La maladie, quant à elle, affecte indifféremment tous les êtres pluricellulaires et repose sur des dérèglements de la croissance des cellules qui les composent (Pitot, 1978).

Hippocrate fut probablement le premier à entreprendre une description systématique des manifestations de la maladie et à établir une classification des néoplasmes, dès le 4^e siècle av. J.-C., proposant diverses méthodes de traitement. Les écrits grecs furent cependant perdus dans l'incendie de la Bibliothèque d'Alexandrie. Un retard de plusieurs siècles fut pris, en raison de la théorie des quatre "humeurs". La doctrine "infaillible" élaborée sur cette base par Galien et qui consistait à guérir ce mal "biliaire" par des purgatifs "internes" empêcha toute expérimentation systématique jusqu'à la Renaissance.

Ce n'est qu'après la découverte de la circulation sanguine par Harvey et la description des vaisseaux lymphatiques par Rudbeck, que le chirurgien parisien Henri François Le Dran affirma, en 1757, que la théorie "humorale" était caduque. Il proposa que le cancer fût considéré comme une maladie évoluant à partir d'une lésion locale primaire et ce à travers les vaisseaux lymphatiques.

La fin du 18^e siècle est marquée par des avancées décisives. Bernard Peyrilhe (1735-1804) fut le premier à conduire une recherche expérimentale systématique sur les causes du cancer (Bett, 1957). En 1801, sans l'aide du microscope, Xavier Bichat établit la distinction entre le "stroma" non-cancéreux et le parenchyme tumoral et suggère que le cancer est une formation "accidentelle" de tissu, faite pourtant de la même manière que le tissu normal.

Récamier (Récamier, 1829) introduit le terme de "métastase" (du grec *μετα* : ailleurs et *στασις* : arrêt, installation) pour expliquer l'invasion des vaisseaux par les cellules dérivant de la tumeur initiale, dans le cas d'un nodule cérébral apparu chez une patiente atteinte de cancer du sein.

L'invention du microscope photonique par Antonie Van Leeuwenhoek, en 1674, permit le développement de la recherche histologique. Sir Everard Home fut le premier à inclure des illustrations de coupes microscopiques de tumeurs dans un ouvrage datant de 1830 et intitulé "A short tract on the formation of tumours". Johannes Müller, dans son livre intitulé "*Über den feinern Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste*" (1838), décrit différents types de tumeurs, microscopiquement distincts et établit de même que l'anaplasie est une caractéristique fréquente des cellules malignes. La théorie cellulaire du cancer venait de naître.

L'élève de Müller, Rudolf Virchow, dans le premier volume des fameuses "Archives" qui portent son nom (1847), émit l'hypothèse selon laquelle le cancer était induit par une irritation chronique locale, attribuant ensuite ("*Die krankhaften Geschwülste*", 1863-1867) l'origine des carcinomes au tissu conjonctif. Cette théorie fut infirmée par la suite et Carl Thiersch proposa, en 1865, que l'origine du cancer fût épithéliale, ce qui fut confirmé par les travaux de Waldeyer - Hartz en 1867 et 1872 (Bett, 1957).

En 1851, Joseph Leidy rapporta la première tentative de transplantation expérimentale d'une tumeur maligne. Arthur Nathan Hanau, en 1889, fut le premier à réussir cette transplantation chez le Rat. Cette technique fut développée par Carl Oluf Jensen qui réussit, en 1903, à maintenir une greffe de cancer murin à travers dix-neuf générations, sans altérations de la structure microscopique, discréditant ainsi la théorie de l'infectivité des cancers.

Le début du 20^e siècle fut marqué par la démonstration de la transmissibilité d'un sarcome aviaire par un filtrat tumoral dépourvu de cellules. Cette découverte fondamentale de Francis Peyton Rous (1910-1911) est à l'origine de la virologie moléculaire. En effet, le virus RSV sera identifié quelques années plus tard comme étant responsable de cette transmissibilité (voir la revue de Svoboda, 1986).

Le début de la cancérogénèse expérimentale date de 1912, date à laquelle Bayon put produire des tumeurs en injectant du goudron dans les oreilles de lapins. Dès 1929, les premiers cancérogènes de synthèse furent préparés par Goulden (1,2,5,6-dibenzanthracène et son dérivé 3'-méthylé)(Bett, 1957). A l'heure actuelle, l'impact des cancérogènes chimiques est connu au plan moléculaire (Weinstein, 1981).

Dans les années 1930, Lacassagne, puis Burrows, montrèrent que l'administration persistante d'œstrogènes conduisait à l'apparition de tumeurs mammaires chez la Souris, ouvrant ainsi la voie de la cancérologie hormono-dépendante (Bett, 1957).

Trois thèses étiologiques se sont opposées au cours de ces quelques siècles de recherches, mais semblent aujourd'hui concordantes, chacune avec ses limitations :

- La thèse "embryonnaire", selon laquelle les cellules tumorales seraient présentes dès la naissance et évolueraient en cancer au cours de la vie adulte : c'est le cas des *nævi* cutanés ("grains de beauté") qui peuvent évoluer en cancer, mais avec une incidence quasi-nulle.

- La thèse "cellulaire", selon laquelle les cellules cancéreuses dérivent de cellules normales "converties" d'une quelconque manière. En effet, des tissus externes et internes peuvent dériver en cancer à la suite d'interventions extérieures répétées (blessure chronique, présence d'un agent

cancérogène chimique, radiations...).

- La thèse "infectieuse", selon laquelle la maladie est provoquée par des agents pathogènes.

Cette dernière théorie émergea, logiquement, après l'époque pasteurienne, les scientifiques cherchant une origine parasitaire du cancer. A la lumière de la découverte de Rous et l'avènement de l'ère de la génétique moléculaire, cette thèse est, à présent, parfaitement admise.

Notons, en marge de ces théories, que le cancer est également considéré comme une maladie auto-immune, au moins en ce qui concerne des sarcomes expérimentaux induits par le 3-méthyl cholanthrène (Prehn & Prehn, 1987).

Le 20^e siècle apparaît comme le "siècle d'or" de la cancérologie. En effet, les dernières décennies ont permis d'aborder l'origine des cancers de plus en plus finement, "descendant" ainsi du niveau microscopique et cellulaire, au niveau moléculaire et permettant de guérir, à force de résultats de multiples recherches, la maladie dans la majorité numérique des cas. Alors qu'un patient sur cinq seulement était guéri en 1930, le cancer n'est plus aujourd'hui le "mal incurable" et n'est plus perçu comme tel. Il n'en reste pas moins vrai que la métastase cancéreuse est encore très fréquemment fatale, suscitant, par là-même, de nombreuses recherches. En effet, 60 à 80 % des cancers humains sont dus à des facteurs environnementaux (Weinstein, 1981) ; des causes encore inconnues ou méconnues du cancer sont les composés chimiques naturels ou artificiels, les initiateurs et promoteurs tumoraux divers, les virus, les cofacteurs nutritionnels, voire psychologiques et... les interactions de tous ces facteurs !

Ainsi, *"The history of cancer [...] is the history of errors, of illusions, of disappointments, of occasional triumphs. The smile of the Sphinx continues inscrutable"* (Bett, 1957).

2. Définitions

Certains termes employés en cancérologie expérimentale sont sujets à déviation et peuvent prêter à confusion. Sans prétendre porter de jugement définitif sur chaque terme, nous allons cependant en préciser quelques-uns :

"La **tumeur vraie** ou **néoplasme** (du grec *νεος* : nouveau et *πλασμα* : chose façonnée, création) est une masse anormale de tissu dont la croissance excède –et n'est pas coordonnée avec– celle des tissus normaux et qui persiste de la même manière excessive après la cessation des stimuli qui ont produit cette croissance" (Willis & Willis, 1972) (traduction personnelle). En effet, les termes "non-coordonnée" et "excessive" permettent de distinguer la tumeur de toute autre croissance cellulaire, telles la prolifération réparative, l'hyperplasie ou la malformation ; les cellules néoplasiques continuent à se multiplier, formant une masse croissante de tissu superflu. De même, la cessation du stimulus entraîne l'arrêt des mitoses d'un tissu normal (cas d'une plaie réparée), mais pas celles d'un tissu cancéreux. La prolifération peut continuer indéfiniment après les modifications provoquées par un agent cancérogène et la tumeur peut être transplantée ou propagée par culture *in vitro* en gardant ses propriétés néoplasiques.

La **métastase** ou **tumeur métastatique** est une tumeur dérivant de la tumeur primaire et située à **distance** de celle-ci. Le processus donnant naissance à de telles tumeurs secondaires est classiquement décrit comme une cascade d'événements comportant la dissociation spontanée du tissu tumoral, l'infiltration de cellules tumorales dans la circulation, puis de l'arrêt de ces cellules au

niveau d'un tissu-cible (Carter, 1976 ; Nicolson, 1982 ; Smets & Van Beek, 1984 ; Liotta *et al.*, 1986 ; Parish *et al.*, 1987).

La **malignité** d'une tumeur est une notion relative, correspondant à la capacité que possèdent ses cellules à **envahir** les tissus environnants, à **s'invaginer** dans les vaisseaux et à produire éventuellement (mais pas toujours) des métastases conduisant à la mort du patient. A l'opposé, une tumeur **bénigne** croît lentement, reste circonscrite localement, n'est pas invasive et ne produit pas de métastase.

Au plan histologique, les cellules des tumeurs bénignes présentent une différenciation tissulaire les rapprochant de leurs homologues normales, alors que les cellules malignes sont fréquemment anaplasiques (c-à-d. imparfaitement différenciées) voire métaplasiques (transdifférenciées), le degré de malignité étant généralement proportionnel au degré d'anaplasie ou de métaplasie (Willis & Willis, 1972).

Enfin, une tumeur bénigne peut disparaître en se fibrosant, se calcifiant ou s'enkystant, ce qui est extrêmement rare pour une tumeur maligne.

La notion de **cellule transformée** est, de même, une notion relative, reposant sur des **critères de transformation** (voir les travaux de Montesano *et al.*, 1977 et San *et al.*, 1979), qui sont principalement :

- Des critères **morphologiques**, décelables au microscope : la transformation se traduit entre autres par des changements de la forme cellulaire et/ou de la biréfringence des bords cellulaires et des noyaux. Le cytosquelette, responsable du maintien de la morphologie cellulaire, est donc affecté par la transformation (voir la revue de Ben-Ze'ev, 1985).

- Des caractéristiques de **croissance *in vitro*** : la cellule transformée acquiert la capacité de croître en milieu semi-solide (agar mou) et d'y former des clones. Elle perd, du moins en partie, la dépendance vis-à-vis du sérum de veau fœtal et peut donc se maintenir en culture *in vitro* dans un milieu minimum. Les mitoses sont plus fréquentes, le cycle cellulaire est plus court et les cellules perdent l'**inhibition de croissance par contact** (en anglais "topo-inhibition" ou "contact inhibition"). Cette notion fut introduite dans les années 1950 (Abercombie & Heaysman, 1954 et 1957 ; Abercombie & Ambrose, 1958 ; voir également Ambrose & Easty, 1967 et Dulbecco, 1970). L'aspect des cultures au microscope est alors typique : les cellules ne s'arrêtent pas à confluence en "monocouche", mais continuent à se diviser en couches superposées, chacune servant de substrat à la suivante.

- Des caractéristiques du **comportement *in vivo*** : les cellules normales ne sont que très rarement tumorigènes, alors que les cellules transformées, injectées à un animal de laboratoire, produisent des tumeurs, souvent malignes.

- Des caractéristiques **biochimiques** : la cellule transformée exprime en surface des antigènes modifiés (néo-antigènes), devenant des **marqueurs de la transformation** (Neville, 1986) (cf. "Le Phénotype Malin", ci-dessous) et possède un métabolisme général modifié (à titre d'exemple, voir Matsuno, 1987). L'altération profonde de la vie "sociale" de la cellule transformée correspond à des modifications de ses activités nucléaires. Nous allons évoquer dans les chapitres suivants certaines des modifications génotypiques et phénotypiques qui accompagnent la transformation.

* Remarque : La terminologie des néoplasmes exposée jusqu'ici ne concerne que les tumeurs dites "solides", c'est-à-dire "croissant au sein de tissus solides". Les cellules du tissu "fluide" qu'est le milieu sanguin sont également sujettes à transformation, sans pour autant produire des "tumeurs" primaires, puisqu'elles se multiplient en suspension *in vivo*.

C. ONCOGENES

1. Définitions

Les **gènes oncogènes** (du grec *ογκος* : volume, "tumeur" et *γεννησις* : naissance, création, "genèse"), sont des gènes dont l'expression incontrôlée peut conduire la cellule à la transformation.

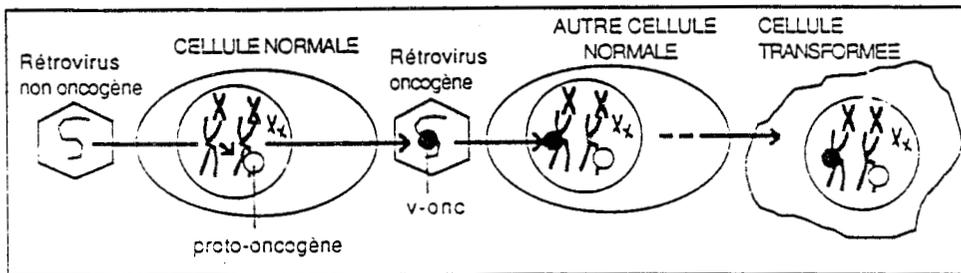
Le terme de **proto-oncogène** a été introduit (Bishop, 1981) pour dénommer des oncogènes cellulaires découverts dans le génome des rétrovirus. Il a été également utilisé par Weinberg pour désigner des gènes cellulaires dont la modification fournit des oncogènes actifs dans le DNA de tumeurs (Weinberg, 1982 et 1982a). Ce terme regroupe depuis ces deux catégories de gènes cellulaires (Bishop, 1983).

Une distinction est faite entre les **oncogènes viraux, v-*onc*** (revue de Bishop, 1985) et leurs homologues **cellulaires, c-*onc*** (revue de Varmus, 1984). Ces "gènes de cancer" sont originaires de gènes normaux, retrouvés dans le patrimoine génétique des cellules normales. Les *v-*onc** dérivent probablement des *c-*onc** et ont été "volés" à la cellule eucaryote lors d'une infection virale non-cancéreuse (voir la revue de Stéhelin, 1988 et la figure 2 qui lui est empruntée). Cependant, cette dernière affirmation n'est pas universelle. En effet, des *c-*onc** non apparentés à des *v-*onc** ont été identifiés (voir la revue critique de Garrett, 1986).

Les *c-*onc** se comportent comme des loci mendéliens classiques. Ils sont reconnaissables sur les caryotypes et ségrègent comme des caractères normaux (revue de Bishop, 1983). Ils sont présents chez tous les organismes eucaryotes, depuis les Levures (Papageorge *et al.*, 1984 ; Schmitt *et al.*, 1986), ce qui indique qu'il s'agit de gènes nécessaires à la vie cellulaire.

L'**activation** d'un proto-oncogène est un processus conduisant au "réveil" de son activité, qui devient suffisante pour transformer la cellule. L'activation peut se faire :

- par **mutation ponctuelle**, à l'exemple des oncogènes de la famille *ras* (Tabin *et al.*, 1982 ; Spandidos & Wilkie, 1984) et *neu* (Bargmann *et al.*, 1986) (voir aussi la mini-revue de Loucheux-Lefebvre, 1987),
- par **translocation chromosomique** comme, par exemple, celle que subit l'oncogène *myc* et qui est responsable du lymphome de Burkitt (voir la revue de Stéhelin, 1988),
- par **amplification** locale d'un chromosome qui conduit à la surexpression d'un oncogène se trouvant dans le segment amplifié (voir également la revue de Stéhelin ci-dessus),
- par **suppression de l'activité anti-oncogène**. Les anti-oncogènes sont un groupe de gènes dont les caractéristiques sont encore peu connues (Klein, 1987 ; Anderson & Spandidos, 1988). Leur rôle éventuel dans la métastase est également inconnu (Parish *et al.*, 1987). Pour une revue



Un virus ancestral a intégré son génome dans les chromosomes d'une cellule infectée. Ce génome a transduit un proto-oncogène cellulaire qui passe ainsi sous le contrôle du virus. Une cellule normale infectée par le virus recombinant ne peut plus contrôler le fragment transduit et activé (oncogène) et se met ainsi à croître de façon anarchique.

Figure 2 : Transduction d'un proto-oncogène par un virus (selon Stéhelin, 1988).

succincte des propriétés du gène *rb-1* le lecteur pourra se référer à Klein & Klein, 1985 et Sachs, 1987.

La "réussite" de la transformation *in vitro* dépend parfois de la **coopération d'oncogènes** (figure 3) à l'exemple de *myc* et *ras* (Land *et al.*, 1983 ; voir aussi la revue de Saule, 1987). *In vivo*, la coopération est très souvent nécessaire pour produire des cancers (revue de Garrett, 1986). La cancérogenèse apparaît comme un processus "multi-étapes" (revues de Garrett, 1986 ; Saule, 1987 ; Spandidos, 1988) faisant intervenir la coopération d'oncogènes (Davenport *et al.*, 1988) ; nous reviendrons sur cette notion dans le paragraphe ci-dessous concernant les rôles des oncogènes.

2. Stratégie d'isolement

La stratégie la plus courante pour détecter une "activité-oncogène" d'un fragment de DNA consiste à introduire ce fragment par **transfection** (Graham & Van der Eb, 1973) dans des fibroblastes NIH 3T3 de Souris. Si un gène transformant est présent dans le génome transfecté, les cellules ayant incorporé ce gène formeront un **foyer de transformation**. Les techniques du génie génétique permettent d'isoler ce gène par la suite (voir Lemoine *et al.*, 1987). La figure 4 (empruntée à Saule, 1987) illustre le principe de ce "test 3T3".

3. Rôles des oncogènes

Depuis la découverte de *c-src*, premier *c-onc* homologue d'un *v-onc* retrouvé dans le génome aviaire normal (Stéhelin *et al.*, 1976) et la démonstration que les chromosomes transformants sont transférables dans des cellules "réceptrices" (Spandidos & Siminovitch, 1977 ; Spandidos & Siminovitch, 1978), la recherche sur les oncogènes a littéralement explosé. Dix ans après, de multiples rôles de ces gènes sont reconnus (Bishop, 1987) et les mécanismes de la transformation maligne commencent à être abordés au plan moléculaire. A la vue de la bibliographie actuellement en pleine "phase exponentielle de croissance", il est illusoire de prétendre inclure, dans une seule revue, tous les rôles des oncogènes. Nous allons, par conséquent, nous limiter à citer les traits généraux que l'on peut en dégager à l'heure actuelle (voir les revues de Saule, 1987 ; Bishop, 1987 et Chambers & Tuck, 1988).

Les oncogènes se trouvent impliqués dans :

- La **mitose** normale et la transduction de signaux à travers la membrane plasmique (figure 5).
- Le contrôle de la **croissance cellulaire** (voir la revue de Hunter, 1985).
- La **différenciation cellulaire** (voir la revue de Saule, 1987 à laquelle la figure 6 est empruntée).
- La **transformation cellulaire *in vitro*** (voir la revue de Spandidos & Anderson, 1987).
- La **cancérogenèse multi-étapes** et la diffusion métastatique des cellules *in vivo* (figure 7). Le rôle des oncogènes dans les cancers humains est indiscutable (voir Trainer *et al.*, 1988 ; les revues de Der, 1987 ; Nishimura & Sekiya, 1987 ainsi que la revue de Sporn & Roberts, 1985 sur les facteurs tumoraux autocrines). Ils sont également impliqués dans la cancérogenèse multi-étapes ("multi-stage carcinogenesis") (Spandidos, 1988 ; Davenport *et al.*, 1988 ; Saule, 1987 ; Nowell,

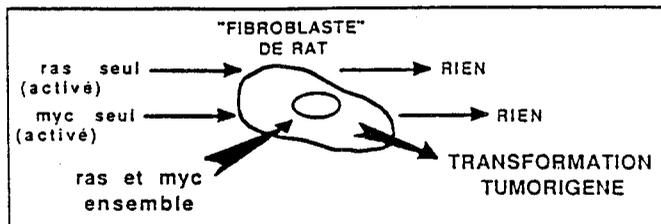


Figure 3 : Schématisation de la coopération d'oncogènes à l'exemple de *ras* et *myc* (Stéhelin, 1988).

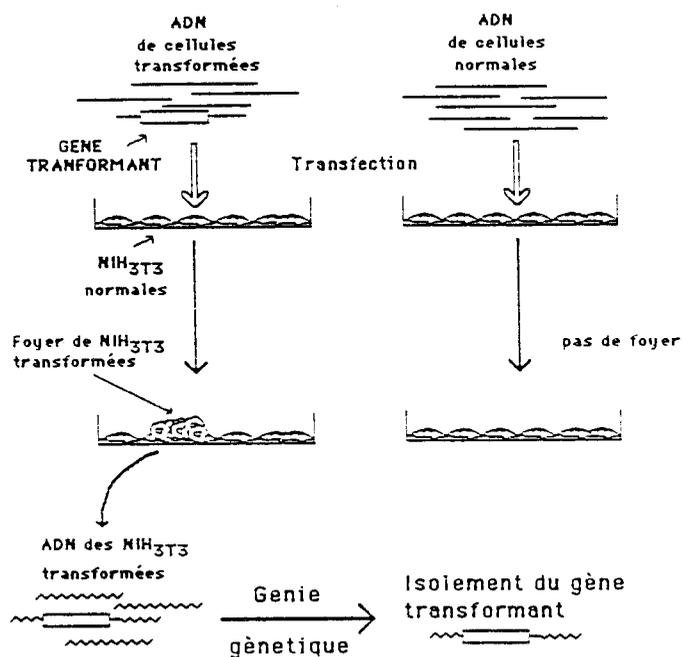


Figure 4 : Stratégie du "test 3T3" (selon Saule, 1987).

1986 ; Klein & Klein, 1985). Il faut noter en outre les travaux (Pozzatti *et al.* 1986) décrivant des potentiels métastatiques différents selon que des cellules embryonnaires de Rat sont transformées par un ou deux oncogènes.

Plusieurs **facteurs de croissance** dont le métabolisme est relié aux oncogènes sont impliqués dans la transformation cellulaire ou la cancérisation (Heldin & Westermark, 1984) et certains d'entre eux sont impliqués dans l'angiogénèse tumorale (cf. paragraphe "Surface cellulaire" plus loin). Citons parmi ces facteurs :

- L'angiogénine (cf. p. 39 ci-dessous).
- Les CSF (Colony-Stimulating Factors) (cf. Roussel *et al.*, 1987).
- L'EGF (Epidermal Growth Factor) (cf. Singletary *et al.*, 1987).
- Les FGF (Fibroblast Growth Factors) (cf. Rizzino *et al.*, 1986 ; Gospodarowicz, 1988).
- Le NGF (Nerve Growth Factor) (cf. Levi-Montalcini, 1987).
- Le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) (cf. Roos *et al.*, 1986).
- Les TGF (Tumor Growth Factors) (cf. Sporn *et al.*, 1987 ; Keski-Oja *et al.*, 1987 ; Gentry *et al.*, 1987).

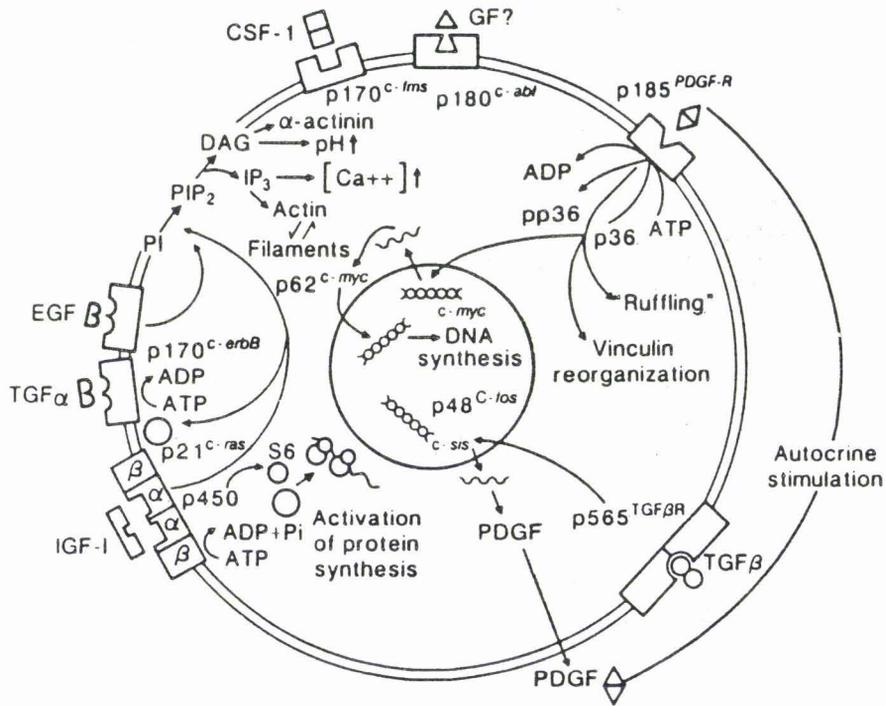


Figure 5 : Schéma de l'implication de divers proto-oncogènes dans la transduction de signaux mitotiques à travers la membrane plasmique. Les récepteurs à des facteurs de croissance sont schématisés au niveau de la membrane plasmique. Les oncogènes *c-myc* et *c-sis* sont représentés dans le noyau sous forme de doubles hélices. Le système régulateur des phospho-inositols est indiqué (Goustin *et al.*, 1986).

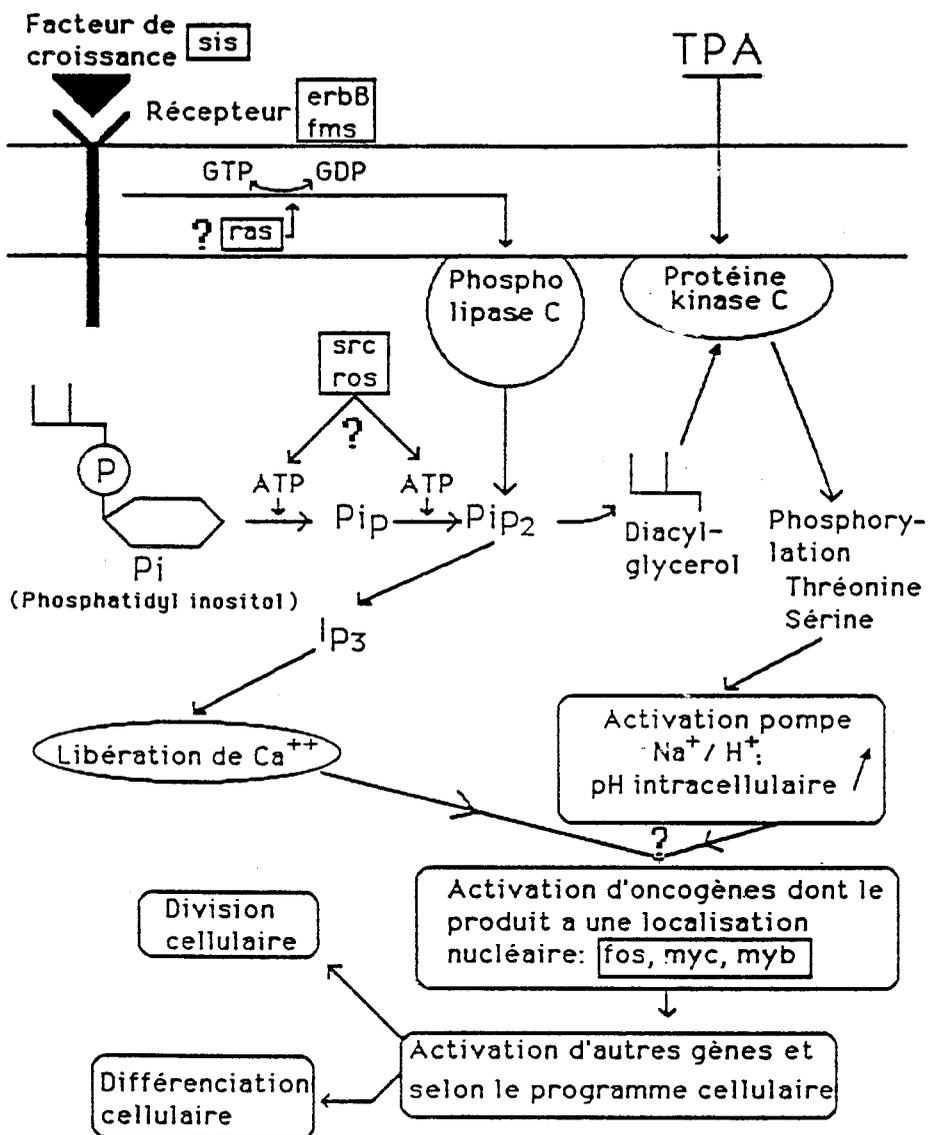


Figure 6 : La "cascade" des oncogènes dans la mitose et la différenciation, implication des phospho-inositols et des kinases intracellulaires (selon Saule, 1987).

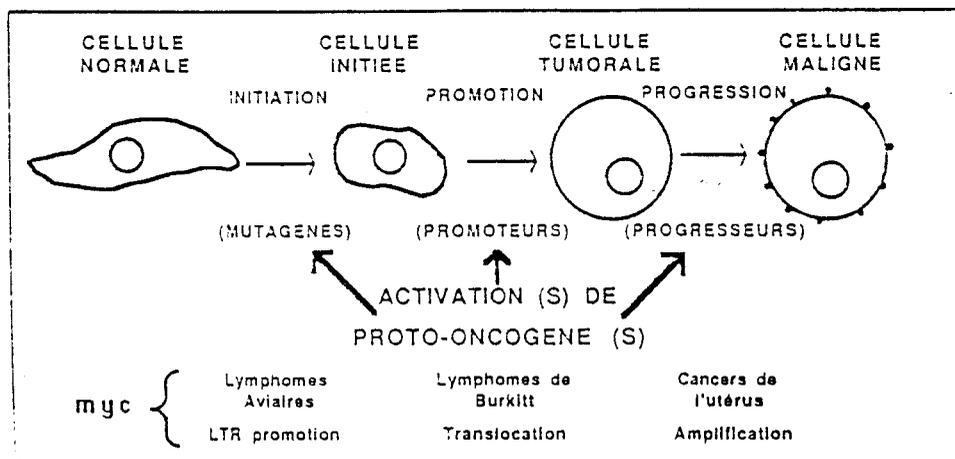


Figure 7 : Représentation schématique de la tumorigénèse "multi-étapes" (selon Stéhelin, 1988).

C. GLYCOCONJUGUES CELLULAIRES

1. Définitions et remarques générales

Les **glycoconjugués** sont une classe de molécules formées de l'association covalente d'une partie oligosaccharidique, le **glycane**, avec une protéine (**glycoprotéine**) ou un lipide (**glycolipide**) (voir les revues de Montreuil, 1980, 1982, 1984, 1984a et 1987).

Les glycannes sont eux-mêmes formés de l'enchaînement de **monosaccharides** conjugués par des **liaisons glycosidiques**. Les monosaccharides majeurs sont au nombre de sept (présentés dans la figure 3-1) : glucose (**Glc**), galactose (**Gal**), mannose (**Man**), fucose (**Fuc**), N-acétylglucosamine (**GlcNAc**), N-acétylgalactosamine (**GalNAc**) et différents acides sialiques, dont l'acide N-acétylneuraminique (**NeuAc**). Les acides sialiques présentent une grande hétérogénéité (Corfield & Schauer ; Schauer, 1982). Ils sont considérés comme des signaux de reconnaissance ou des résidus nécessaires à la mise en conformation des glycannes (Montreuil, 1984). Des monosaccharides mineurs sont également rencontrés dans les glycannes, tels l'arabinose (**Ara**), le xylose (**Xyl**)...

Les monosaccharides se trouvent le plus souvent sous la configuration D- (à l'exception du Fuc qui se trouve sous forme L-) dans les glycannes. D'autre part, ces monomères peuvent présenter une anomérie du carbone n° 1 et être liés entre eux par tel ou tel autre des hydroxyles portés par les carbones n° 1 à 6. Il en résulte une multitude de structures possibles qui rend leur analyse extrêmement difficile ; en effet, de par la complexité de leur structure primaire ("séquence" de monosaccharides et différentes isoméries possibles), la conformation spatiale adoptée par les glycannes est variable. Un degré de complexité supplémentaire est acquis au vu de la localisation *in situ* de ces composés ; il est admis, à l'heure actuelle, que les interactions moléculaires (phénomènes stériques et électrostatiques) d'un glycane donné avec la protéine ou l'environnement du lipide qui le porte sont, pour une grande part, responsables de l'adoption d'une **conformation** particulière et de la stabilisation de cette conformation (Montreuil, 1984 ; Brisson & Carver, 1983, 1983a, 1983b).

La **biosynthèse** des glycannes fait intervenir des complexes enzymatiques membranaires, situés pour la plupart dans l'appareil de Golgi. Il existe une **glycosyltransférase spécifique** pour chaque type de liaison glycosidique établie. Le concept "une liaison glycosidique - un enzyme de transfert" fut introduit dans les années 1960 (Hagopian & Eylar, 1968) ; la connaissance actuelle des mécanismes biosynthétiques des glycoconjugués permet de le généraliser (Schachter *et al.*, 1985).

Plusieurs centaines de structures primaires d'oligosaccharides sont décrites à ce jour. Une revue exhaustive de ces structures ne présentant qu'un intérêt documentaire ne sera donc pas exposée ici. Nous nous bornerons à présenter les caractéristiques principales des différents types de glycoconjugués, en prenant des cas particuliers comme exemples. Le lecteur pourra se référer à la littérature pour obtenir davantage de renseignements structuraux et métaboliques sur ces composés (voir les revues de Montreuil déjà citées ; Hakomori, 1983 ; Kobata, 1984 et 1987).

* Remarque : Les structures sont décrites selon la nomenclature officielle de l'IUB (Sharon, 1986 ; Hakomori, 1984) et leur écriture selon ces règles est la seule adoptée.

La recherche sur les glycoconjugués a pris un essor considérable depuis une trentaine d'années à la suite de quelques découvertes fondamentales :

- Démonstration par Morgan et Watkins, en 1952, que les antigènes des groupes sanguins du système ABH sont de nature oligosaccharidique (voir Watkins, 1966).
- Première description d'une structure oligosaccharidique primaire (Gottschalk & Graham, 1959).
- Activité mitogène des lectines de Haricot (Nowell, 1960).
- Agglutinabilité des cellules malignes par la WGA (Aub *et al.*, 1963 ; Aub *et al.*, 1965 et 1965a) et découverte des interactions différentielles de la ConA avec les cellules normales et transformées (Inbar & Sachs, 1969).
- Découverte, en 1968, des lectines membranaires (voir Morell *et al.*, 1971).

A l'heure actuelle, sur la base de la connaissance de leur structures primaire et spatiale, de multiples rôles des glycoconjugués sont reconnus. La connaissance du métabolisme normal et pathologique de ces composés rend compte de leur grande importance dans l'organisme.

2. Les glycolipides

Les glycosphingolipides sont formés de l'association d'un glycanne avec une céramide par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique (figure 8).

Leur classification fut proposée en 1963 (voir Svennerholm, 1964) et adoptée depuis par l'IUB (Hakomori, 1984), de même qu'une série de codes symboliques pour les désigner (figure 9, empruntée à Hakomori, 1983).

Ils sont synthétisés à partir de la céramide, par un complexe enzymatique de glycosyltransférases localisé dans l'appareil de Golgi. Un schéma de la biosynthèse des gangliosides (figure 10) a été proposé par l'équipe de Fishman (Fishman & Brady, 1976).

3. Les glycoprotéines

Les glycannes sont reliés aux protéines par deux principaux types de **liaisons glycosidiques** qui font intervenir:

- soit la fonction hydroxyle d'un résidu d'hydroxy-aminoacide (Ser, Thr, Hyp, Hyl, Tyr) et il en résulte les **O-glycosylprotéines** ;
- soit la fonction ω -NH₂ d'un résidu d'asparagine ; la liaison N-glycosylamine résultante conduit aux **N-glycosylprotéines**.

* Remarque : Certaines protéines peuvent porter à la fois des glycannes liés à la sérine (ou thréonine) et des glycannes liés à l'asparagine ; ce sont les **N-,O-glycosylprotéines**.

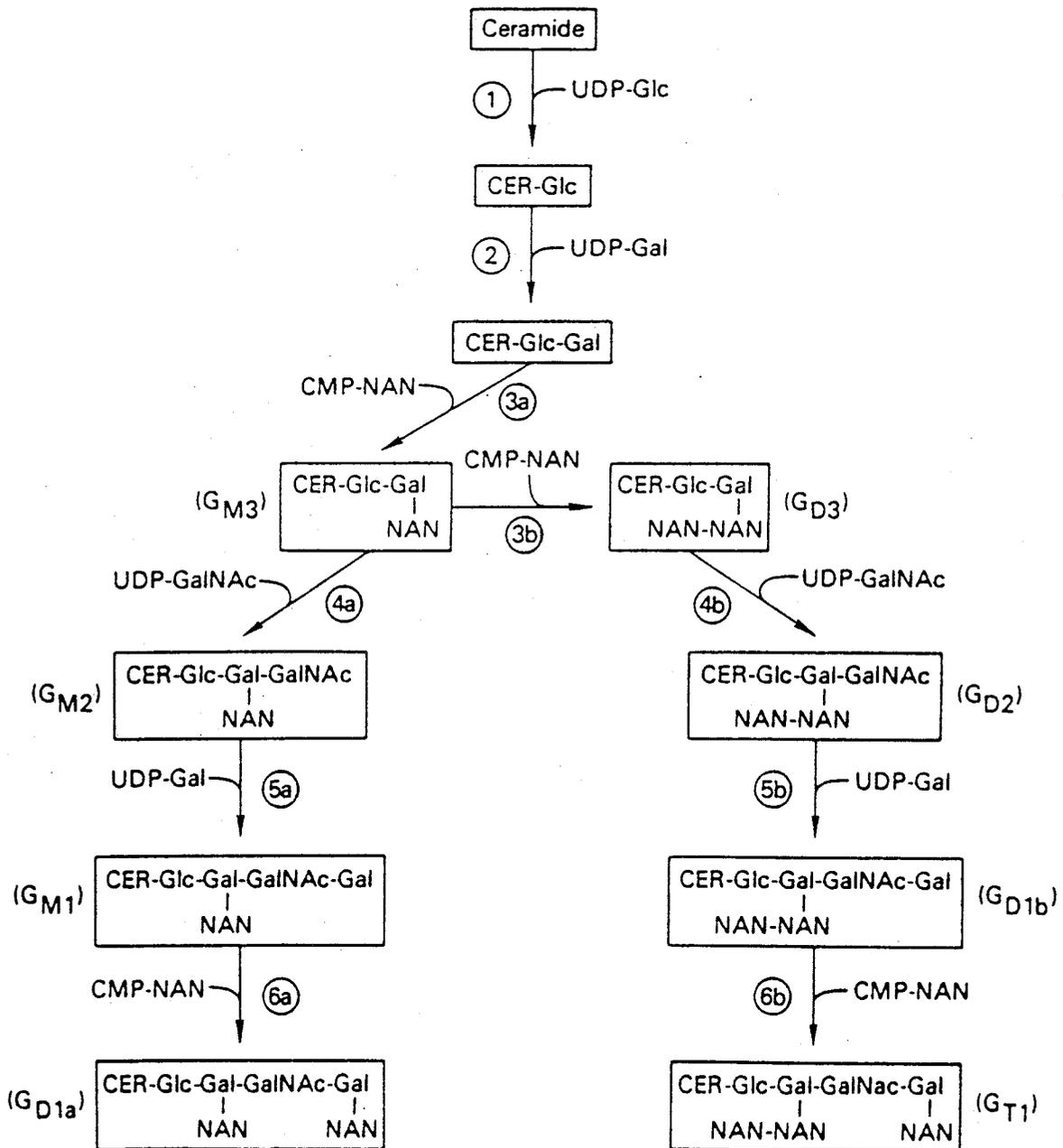


Figure 10 : Biosynthèse des gangliosides. CER : céramide ; NAN : Acide N-acétylneuraminique. Chaque réaction est catalysée par une glycosyltransférase spécifique (Fishman & Brady, 1976).

Tableau I : Exemples de structures glycaniques rencontrées dans les mucines (tirés de la revue de Sadler, 1984)

Structure	Source
I. Ovine Submaxillary Type $\text{Sia}\alpha 2-6\text{GalNAc}\alpha 1-O$	Sheep (9), cow (10), and armadillo (11) submaxillary mucins
II. Porcine Submaxillary Type $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2-6 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1-3 \quad \text{GalNAc}\alpha 1-O \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Gal}\beta 1-3 \\ \quad \quad \quad \diagup \\ \text{Fuc}\alpha 1-2 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2-6 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Fuc}\alpha 1-2 \quad \text{GalNAc}\alpha 1-O \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Gal}\beta 1-3 \end{array}$	Pig submaxillary A ⁺ mucin (12) Pig submaxillary A ⁻ mucin (12) and dog submaxillary mucin (13)
III. Rat Sublingual Type $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2-6 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Sia}\alpha 2-4\text{GlcNAc}\beta 1-3 \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3 \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3 \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3 \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Sia}\alpha 2-6 \quad \text{GalNAc}\alpha 1-O \end{array}$	Rat sublingual (14) and colonic (15) mucins
IV. Ovarian Cyst Fluid Type (a) $\begin{array}{c} \text{GalNAc}\alpha 1-O \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Gal}\beta 1-3 \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6 \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{GlcNAc}\beta 1-3 \\ \quad \quad \quad \diagup \\ \text{Fuc}\alpha 1-4 \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Gal}\beta 1-3 \end{array}$ (b) $\begin{array}{c} \text{GalNAc}\alpha 1-O \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{Gal}\beta 1-3 \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6 \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{GlcNAc}\beta 1-3 \end{array}$	Ovarian cyst fluid mucin (16) Sheep gastric mucin (17)

a. Les O-glycosylprotéines

Le résidu oligosaccharidique le plus fréquemment lié à la sérine (ou thréonine) est l' α -GalNac. Le Tableau I résume quelques structures représentatives de cette famille, rencontrées dans les mucines (Tableau emprunté à la revue de Sadler, 1984).

D'autres types de structures glycaniques sont trouvées dans les O-glycosylprotéines membranaires, plasmatiques, facteurs de la coagulation, immunoglobulines, hormones, protéines-antigel des poissons des mers froides... Ces structures peuvent être linéaires ou branchées, être liées à la protéine par des monosaccharides autres que l' α -GalNac et se terminer, à leurs extrémités non réductrices, par des antigènes de groupes sanguins (pour de plus amples renseignements, se référer à la revue de Sadler, 1984).

Les **protéoglycannes** des matrices extracellulaires sont également considérés comme des O-glycosylprotéines. Ces macromolécules sont formées par l'enchaînement de motifs répétés de disaccharides sulfatés ou phosphorylés qui s'associent à une protéine, elle-même reliée à l'acide hyaluronique par l'intermédiaire d'une protéine de liaison. Il est à noter que les kératane-sulfates sont conjugués à la protéine par une liaison N-glycosidique ; ils sont cependant classés parmi les protéoglycannes, en raison de leur similitude structurale (enchaînement disaccharidique). Nous renvoyons le lecteur à la littérature pour ce qui est de la structure de ces composés, notamment aux ouvrages de Alberts *et al.*, 1983 et Stryer, 1981.

La biosynthèse des glycanes des O-glycosylprotéines fait intervenir des glycosyltransférases hautement spécifiques, indépendantes d'intermédiaires lipidiques (voir la revue de Sadler, 1984). Le lecteur pourra se référer à cette revue pour les détails des voies biosynthétiques, des activités enzymatiques impliquées, ainsi que de leurs caractéristiques mécanistiques et leurs systèmes régulateurs. Sadler rapporte une seule déviation à la règle "une liaison glycosidique - une glycosyltransférase" à propos de l'activité Lewis, la fucosyltransférase qui est responsable de cette activité étant capable de transférer le résidu d' α -Fuc sur celui de GlcNac indifféremment en position 3 ou 4.

Il est à noter, toujours selon Sadler, que le site cellulaire de la O-glycosylation n'est pas encore clairement identifié ; il semblerait que ce type de glycosylation ne soit pas un phénomène co-translationnel, l'essentiel des activités enzymatiques se trouvant dans le réticulum endoplasmique lisse et dans l'appareil de Golgi.

La figure 11 résume les voies de la biosynthèse des O-glycosylprotéines.

b. Les N-glycosylprotéines

La liaison glycosylamine est la seule rencontrée dans les N-glycosylprotéines (elle se trouve également dans certains kératane-sulfates des matrices extracellulaires). Les oligosaccharides des N-glycosylprotéines comportent toujours un **noyau pentasaccharidique** commun, le mannotriosido-di-N-acétylchitobiose, lié à la protéine par l'intermédiaire d'un résidu d'asparagine.

En fonction des substitutions de ce noyau par des monosaccharides supplémentaires, on distingue trois types de glycannes (voir les revues de Montreuil déjà citées) :

- le type **oligomannosidique** ("high-mannose type") : le noyau n'est substitué que par des résidus d' α -Man
- le type **N-acétyllactosaminique** ("complex type") : le noyau est substitué par des résidus de GlcNAc, Gal, Fuc, NeuAc, avec la caractéristique que les α -Man portent au moins le disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc (N-acétyllactosamine)
- le type **mixte** ("hybrid type"), comportant à la fois des résidus de Man et d'autres monosaccharides.

Le terme d'**antenne** a été introduit (Montreuil, 1982) pour rendre compte de la forme des "branches" oligosaccharidiques qui substituent le noyau commun. Ce terme est actuellement adopté et généralisé (Sharon, 1986). Les structures des oligosaccharides sont donc qualifiées de mono-, di-, tri-, tétra-, penta- ou hexaantennées. Des exemples schématiques de ces différentes classes de N-glycosylprotéines sont présentés dans la figure 12.

Les glycannes présentent une micro-hétérogénéité :

- par la fucosylation de la GlcNAc du point d'attache
- par la glycosylation terminale à l'extrémité non réductrice (présence d'acides sialiques différents, liés en α 2-3 ou α 2-6, fucosylation terminale excluant alors la présence d'acide sialique et vice-versa). Par ailleurs, les oligosaccharides peuvent porter des groupements chargés autres que les acides sialiques, tels des phosphates ou des sulfates.

La biosynthèse des N-glycosylprotéines est extrêmement complexe ; elle fait intervenir plusieurs compartiments cellulaires et un équipement glycosyltransférase particulier. Elle est décrite comme un **phénomène** à la fois **co- et post-translationnel**, la protéine naissante dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER) étant chargée très tôt d'un oligosaccharide précurseur. Trois étapes majeures se dégagent au cours du processus (voir les revues de Snider, 1984 et de Verbert *et al.*, 1987) :

- dans un premier temps, l'oligosaccharide précurseur est formé, ancré à la membrane du RER par un intermédiaire lipidique, le **dolichol-pyrophosphate** ;
- le précurseur est ensuite transféré en bloc sur la protéine naissante (pour le rôle-clé de ce transfert, voir Kaplan *et al.*, 1987) et subit une dégradation séquentielle par des glycosidases ("**trimming**") ;
- la troisième étape se déroule dans l'appareil de Golgi ; elle consiste en une "**maturation**" des glycannes par addition successive, séquentielle et spécifique des monosaccharides constitutifs du glycanne final.

Ces trois étapes sont résumées dans la figure 13.

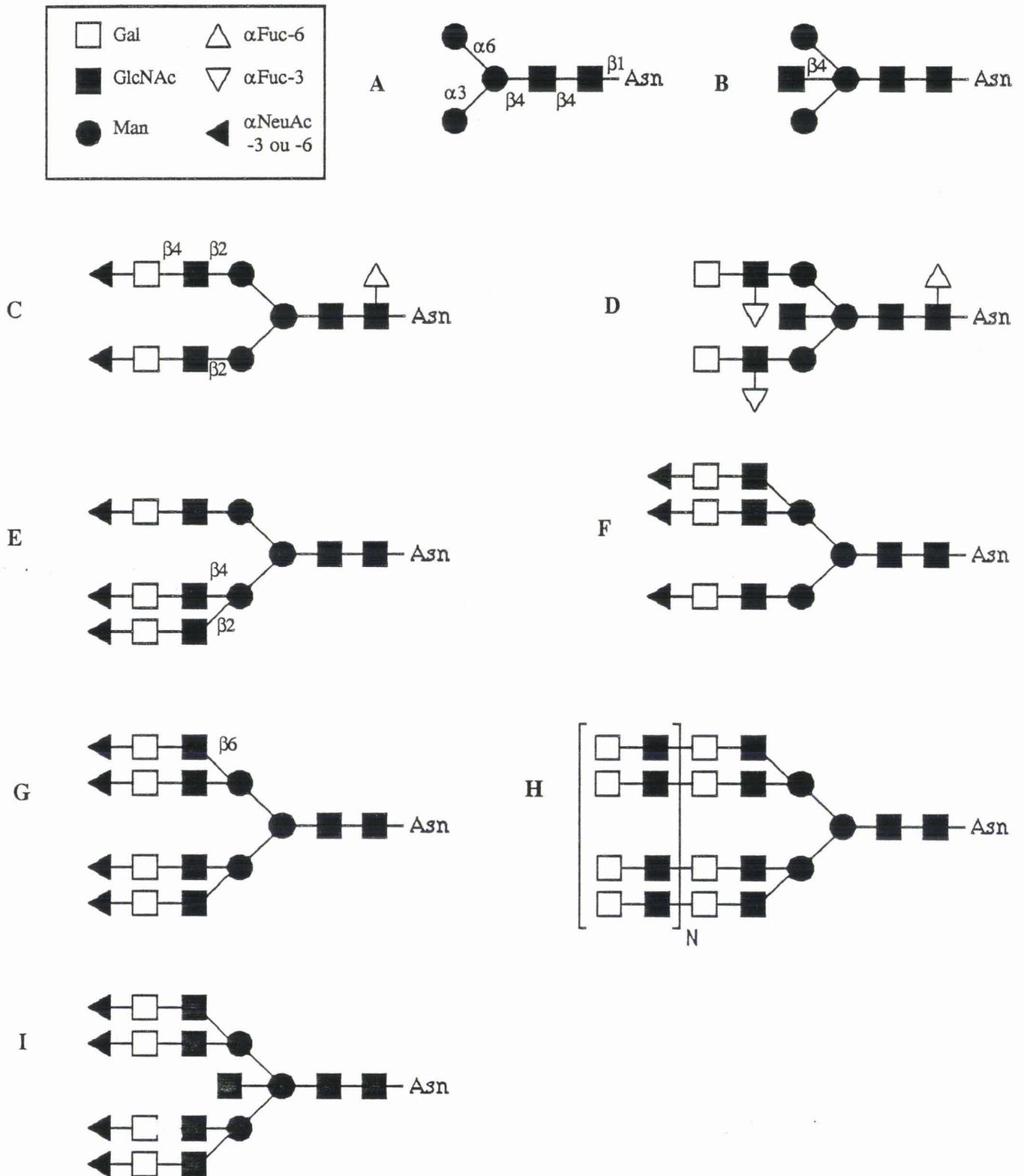


Figure 12 : Variabilité des structures glycaniques liées à l'asparagine. Représentations schématiques de structures N-acétyllactosaminiques biantennées (C, D) ; triantennées (E, F) ; tétraantennées (G, H, I). Le noyau invariable des glycanes liés à l'asparagine est représenté sans (A) et avec (B) un résidu d'osamine intercalaire.

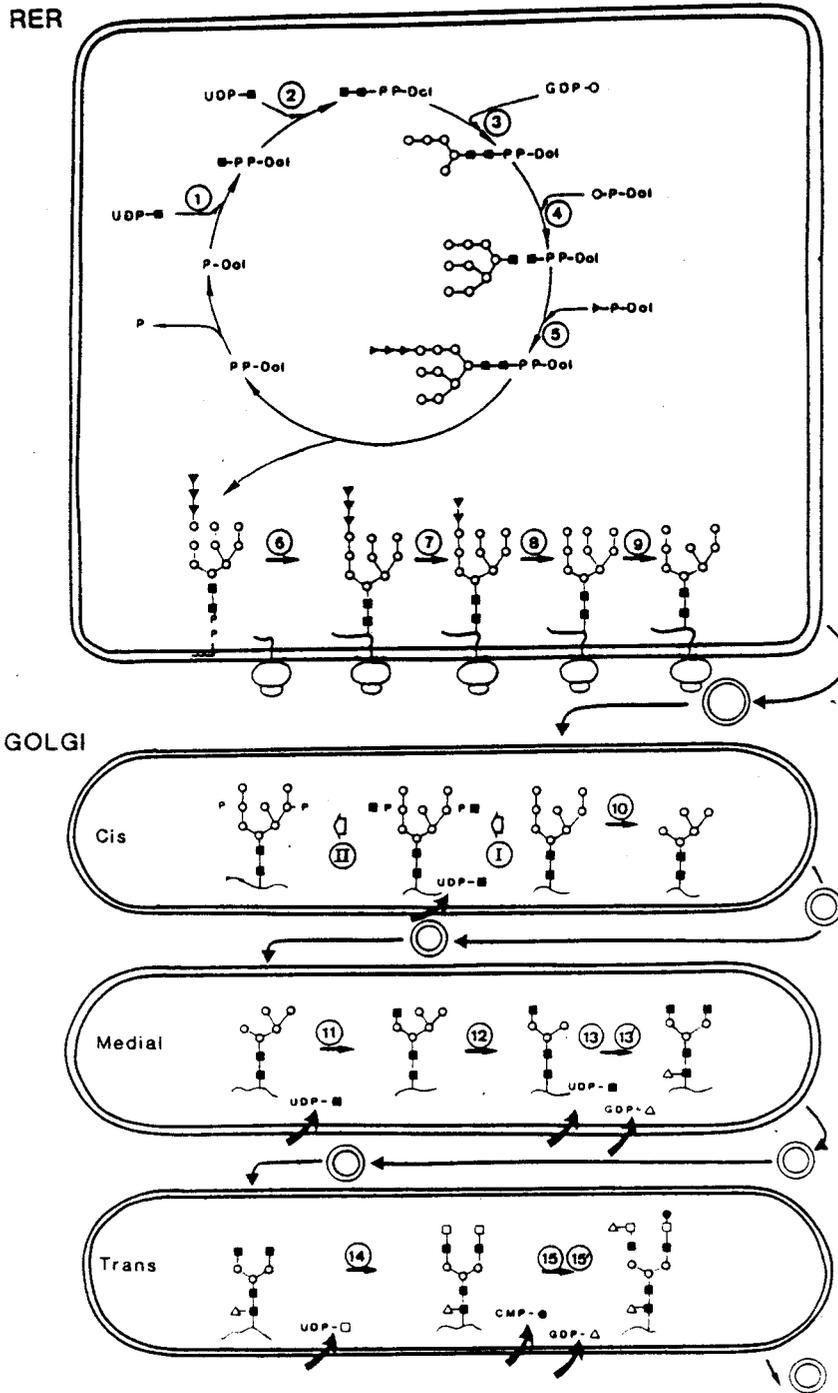
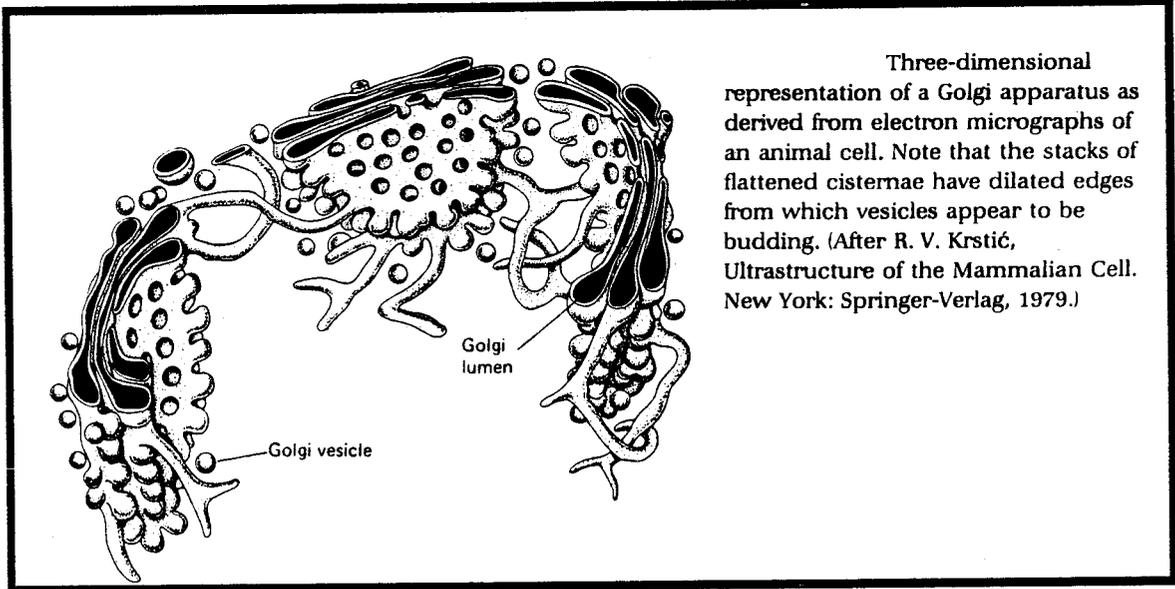


Fig. 1. Schematic pathway of N-linked oligosaccharide synthesis and processing. The reactions 1,2,3,4 and 5 are the different steps of the dolichol cycle. Reaction 6 is catalyzed by the oligosaccharidyltransferase. Processing is initiated by the removal of the terminal glucose residue by an α-glucosidase I (reaction 7) and the two inner glucose residues are removed by a single glucosidase II (reaction 8). A specific RER α-1,2 mannosidase (reaction 9) leads to the formation of a Man₅GlcNAc₂ glycan which exits from the RER to the cis Golgi where maturation occurs. The further reactions are catalyzed by the following enzymes: I: N-acetylglucosaminylphosphotransferase; II: N-acetylglucosamine-1-phosphodiester-N-acetylglucosaminidase; 10: Golgi mannosidase I; 11: N-acetylglucosaminyltransferase I; 12: Golgi mannosidase II; 13,13': N-acetylglucosaminyltransferase II and fucosyltransferase; 14: galactosyltransferase; 15,15': sialyl- and fucosyltransferase. The symbols represent: ■ : N-acetylglucosamine; ○ : mannose; ▲ : glucose; △ : fucose; □ : galactose; ● : sialic acid.

Figure 13 : Schéma global de la biosynthèse des glycanes liés à l'asparagine, tiré de la revue de Verbert *et al.*, 1987. La structure tridimensionnelle de l'appareil de Golgi est rappelée en encart (d'après Alberts *et al.*, 1983).

4. Lectines

Les **lectines** (du latin *legere* : opter, choisir) sont des (glyco)protéines non synthétisées par un système immunitaire, capables de reconnaître et de fixer des sucres et qui agglutinent des cellules et/ou précipitent des glycoconjugués (Goldstein *et al.*, 1980). Ces protéines sont multimériques et possèdent au moins deux sites de reconnaissance de sucres.

Certaines lectines végétales sont mitogènes, d'autres sont cytotoxiques et ces propriétés peuvent être mises à profit pour sélectionner *in vitro* des sous-populations de cellules résistantes exprimant peu ou pas d'oligosaccharides reconnus par la lectine.

Leur propriété de reconnaissance de motifs oligosaccharidiques peut également être utilisée pour fractionner des glycanes, glycopeptides ou glycoprotéines sériques ou membranaires. La spécificité des lectines, ainsi que leurs utilisations dans le fractionnement par les techniques de chromatographie d'affinité après immobilisation sur un support, sont décrites dans les revues d'Osawa & Tsuji, 1987 et de Merkle & Cummings, 1987.

Pour une revue historique et pour un exposé complet des propriétés et de l'éventail d'utilisation des lectines, le lecteur pourra se reporter à la revue de Lis & Sharon (1984) et à l'ouvrage de Liener, Sharon & Goldstein (1986).

5. Conclusion

Les glycoconjugués sont des molécules complexes, présentant une grande variabilité. De par les difficultés que pose leur analyse structurale, l'étude de leurs fonctions n'a pu être abordée que depuis une vingtaine d'années seulement. Nous avons évoqué leurs caractéristiques, leurs voies biosynthétiques et certaines de leurs fonctions ; nous focaliserons notre attention sur les rôles qu'ils peuvent jouer dans la "vie sociale" des cellules dans le paragraphe "Surface cellulaire", ci-dessous, où seront exposées leurs implications dans l'adhésion, l'invasion et la diffusion métastatique des cellules tumorales.

D. "SURFACE CELLULAIRE" SIEGE D'INTERACTIONS

"La vie, c'est la communication" (Jean-Luc Godart)

1. Remarques générales

Le terme de "surface" cellulaire est à considérer au sens large : outre la membrane plasmique, il convient d'y faire figurer la couche glucidique externe ("glycocalyx") et la matrice extracellulaire. Le tout forme un ensemble fonctionnel *in vivo*, les interactions étroites entre la cellule et la matrice étant à la base de processus normaux (histogenèse, neurogenèse, angiogenèse) et pathologiques (invasion et métastase). Cet ensemble est par ailleurs en relation avec le cytosquelette.

Une organisation fonctionnelle en "étages" permet à la cellule normale de recevoir des signaux de son environnement, l'appelant à accomplir telle ou telle autre fonction, ou encore à se diviser. Il est alors concevable qu'une perturbation de la vie "sociale" de la cellule aussi profonde que la diffusion métastatique des cellules tumorales, affecte plusieurs de ces "étages organisateurs". Les modifications structurales détectées par de multiples études ne sont que le reflet de modifications génétiques, puisque tous les éléments constitutifs de cet ensemble sont synthétisés par la cellule et se trouvent donc sous le contrôle de son génome.

L'implication des altérations structurales dans le fonctionnement du système est considérée, à l'heure actuelle, comme un épiphénomène. Son importance n'en est pas moins capitale puisqu'à défaut de "corriger" génétiquement les cellules tumorales, la thérapeutique peut s'appuyer sur une élimination sélective de ces cellules (ou de leurs effets néfastes) en mettant à profit les marqueurs qu'elles portent.

Nous allons définir brièvement les composés majeurs de la "surface cellulaire", pour décrire un schéma fonctionnel de l'ensemble. Le comportement malin des cellules métastatiques peut être ramené à des perturbations de ce schéma.

2. La membrane cellulaire

Les **cytomembranes** forment un réseau continu (figure 14) délimitant la cellule de l'environnement et conférant à celle-ci sa caractéristique d'"unité vivante". Les cytomembranes permettent en outre la **compartimentation** qui est une des clés du fonctionnement cellulaire en tant que mode de régulation de ce fonctionnement.

Toutes les cytomembranes et la **membrane plasmique** en particulier sont formées par l'association d'une multitude de macromolécules, organisées en un ensemble fluide, non figé dans l'espace et le temps. Cette organisation en **mosaïque fluide** a été modélisée dans un travail devenu classique (Singer & Nicolson, 1972 ; voir aussi le récent modèle de Mountford & Wright, 1988). La membrane plasmique est constituée d'une **double couche** de lipides complexes bipolaires formant une matrice hydrophobe au sein de laquelle "flottent" les autres constituants membranaires : (glyco)protéines, glycosphingolipides, cholestérol... Cette bicouche lipidique est

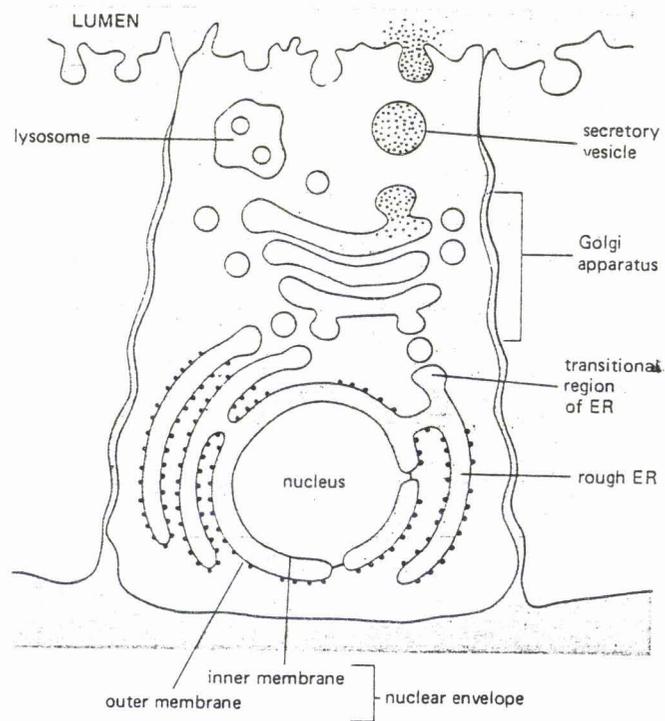


Figure 14 : Le réseau de cytomembranes. Les compartiments topologiquement équivalents sont indiqués en gris (Alberts *et al.*, 1983).

responsable du maintien de la **fluidité membranaire** puisqu'elle contient des molécules qui stabilisent ou déstabilisent localement la fluidité (Shinitzky, 1984).

La membrane plasmique présente une **asymétrie fonctionnelle** (Rothman & Lenard, 1977). 2 à 10 % en poids des membranes plasmiques normales sont constitués de **glucides** (Alberts *et al.*, 1983). En particulier, la copule glucidique des composés membranaires est toujours située à l'extérieur de la cellule et forme en partie le "glycocalyx", considérablement épaissi quand la cellule se transforme (figure 15, tirée de Torpier & Montagnier, 1969). Les glycoconjugués de la surface cellulaire sont considérés, de par leur situation privilégiée, comme des **médiateurs d'interactions cellulaires**, faisant intervenir des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifiques. A ce titre, ils sont impliqués dans la cascade métastatique au niveau de l'invasion et de l'implantation des cellules tumorales au site secondaire (voir plus loin). Les **lectines membranaires** du tissu-"cible", agissant comme des récepteurs de glycannes aberrants (ou, à l'inverse, les lectines portées par les cellules métastatiques servant de "tête chercheuse" du tissu-"cible"), peuvent être impliquées dans la fixation des cellules au site secondaire.

3. Matrice extracellulaire et cytosquelette

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de **collagènes** et d'**élastine**, noyés dans une "substance fondamentale" composée de **protéoglycannes** et de diverses (glyco)protéines, comme la **fibronectine** (revue de Hynes, 1985), la **laminine** (Foidart *et al.*, 1980) ou la **thrombospondine** (Lawler, 1986). Elle est en relation avec le réseau d'actine du **cytosquelette** par l'intermédiaire de **plaques d'adhésion** faisant intervenir une pléiade de protéines intracellulaires telles la vinculine, la vimentine et la taline (consulter Alberts *et al.*, 1983), ou des complexes transmembranaires, tel celui de l'intégrine (Buck & Horwitz, 1987). Le cytosquelette est, quant à lui, responsable des mouvements cellulaires se déroulant au cours de la croissance et de l'invasion tumorale (Raz & Ben-Ze'ev, 1987) ainsi qu'au cours de la différenciation (Ben-Ze'ev, 1987). La matrice joue également un rôle de "filtre" macromoléculaire et influence la différenciation, la morphogenèse et la mitose. L'existence de récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique exerce une influence d'ordre chimique, mais aussi mécanique, sur la cellule. Ceci conduirait à une régulation de l'expression génique en modifiant l'association du cytosquelette avec le matériel génétique. En effet, l'hypothèse d'une "réciprocité dynamique" entre la matrice extracellulaire et le génome a été proposée (Bissell *et al.*, 1982 ; Bissell & Barcellos-Hoff, 1987), le génome contrôlant à son tour la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de ses fonctions biosynthétiques. Plus récemment, Junker & Heine (1987) ont montré l'effet de la matrice extracellulaire sur la croissance de cellules transformées, faisant ainsi apparaître son rôle d'"organite-clé", en tant que médiateur de l'adhésion, dans cette croissance. Si l'hypothèse de Bissell n'est pas encore totalement vérifiée et admise, la complexité connue à ce jour des relations de la matrice extracellulaire avec l'intérieur de la cellule pose des questions sur l'étendue de notre connaissance dans ce domaine. Décrire les composants structuraux du système relève du "jeu de compilation" et intégrer ces composants dans un schéma fonctionnel global demande davantage de connaissances. Certains éléments du "puzzle" sont pourtant en place et concernent les rôles reconnus de la matrice extracellulaire dans la capacité invasive des cellules tumorales.

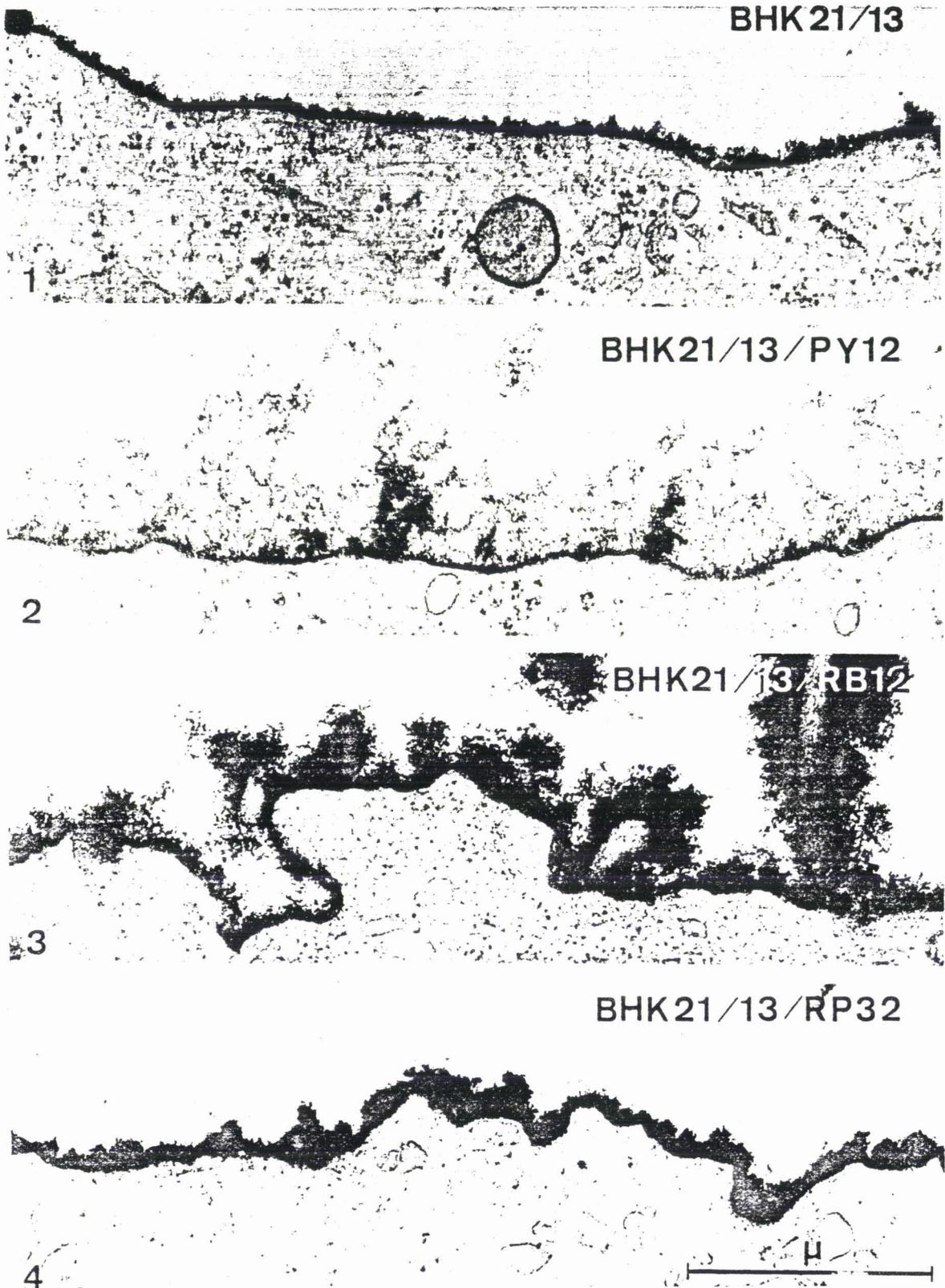


Figure 15 : Epaissement du glycocalyx lors de la transformation cellulaire. Photographie de microscopie électronique (Torpier, 1969). 1 : cellules BHK de référence ; 2, 3, 4 : cellules BHK transformées.

La cellule métastatique doit se frayer un passage à travers l'endothélium à deux reprises au moins : tout d'abord, en quittant la tumeur primaire, pour passer dans la circulation et elle doit ensuite adhérer de nouveau et traverser la barrière endothéliale, ainsi que la lame basale sous-jacente, avant de s'implanter dans le parenchyme du "tissu-cible" (figure 16).

Un nombre impressionnant d'études portent sur cette seule propriété d'invasion des cellules tumorales. Cette propriété fait intervenir non seulement la matrice extracellulaire, topologiquement indispensable, mais aussi le cytosquelette, dans la mesure où la cellule transformée change souvent de forme (figure 17) et que les mouvements cellulaires contribuent à la "réussite" du processus invasif (Grimstad, 1987). Les oncogènes sont probablement impliqués dans les mécanismes de l'invasion mais, faute d'un test précis et universel ainsi que d'une méthodologie déterminée, leur rôle à ce niveau est encore discuté (Mareel & Van Roy, 1986). De tels tests sont actuellement au point (Mareel *et al.*, 1987) qui devraient permettre d'élucider à terme l'implication des oncogènes.

Le rôle de la matrice extracellulaire dans l'invasion est mieux connu, à la lumière de nombreux travaux portant sur les activités protéolytiques des cellules tumorales. Ces dernières sont capables de migrer en dégradant les composés de la matrice ou de la lame basale, par exemple les collagènes (voir les revues de Liotta *et al.*, 1983 ; Terranova *et al.*, 1986).

L'adhésion des cellules tumorales au substrat présente des différences spécifiques à chaque type de tumeur (Varani *et al.*, 1987). L'importance de l'adhésion, en tant que premier événement du processus invasif, est reconnue depuis longtemps (voir Stocker *et al.*, 1968 et les revues de Roos, 1984 ; Fidler *et al.*, 1978). Enfin, l'implication des **molécules d'adhésion cellulaire** (CAM : Cell Adhesion Molecules) est actuellement connue (Edelman, 1985) et les controverses rapportées à propos de leur rôle dans le cancer (Parish *et al.*, 1987) devraient encourager les recherches à leur sujet.

4. Angiogenèse

En marge du schéma fonctionnel de la "surface cellulaire", nous devons faire apparaître l'**angiogenèse** (du grec *αγγειον* : vaisseau et *γεννησις* : genèse).

Si les tumeurs ne contiennent généralement pas de vaisseaux, elles ne sont pas moins intensément vascularisées. En effet, une angiogenèse active a lieu autour des tumeurs en croissance, faisant appel à des facteurs sécrétés par celles-ci (revue de Folkman & Klagsbrun, 1987). Une protéine angiogène, l'**angiogénine**, a été décrite chez des cellules cancéreuses humaines (Fett *et al.*, 1985) et retrouvée depuis dans le plasma humain normal (Shapiro *et al.*, 1987) et le lait de Vache (Maes *et al.*, 1988). Le rôle dans la métastase de cet appel de vaisseaux (figure 18) est "logique" pour des cellules d'une tumeur qui "veulent" métastaser.

Ainsi Folkman émet l'hypothèse selon laquelle toute croissance de tumeur solide est sujette à une néovascularisation préalable, convergeant vers la tumeur (Folkman, 1985). Les oncogènes pourraient être impliqués à ce niveau puisque les **facteurs** (ou des récepteurs membranaires à des facteurs) **angiogènes**, tels les TGF (Tumor Growth Factors), les FGF (Fibroblast Growth Factors) ou l'EGF (Epidermal Growth Factor), sont spécifiés par des oncogènes (Goustin *et al.*, 1986) (figure 5, p. 22). Ces facteurs de croissance sont largement impliqués dans le déroulement

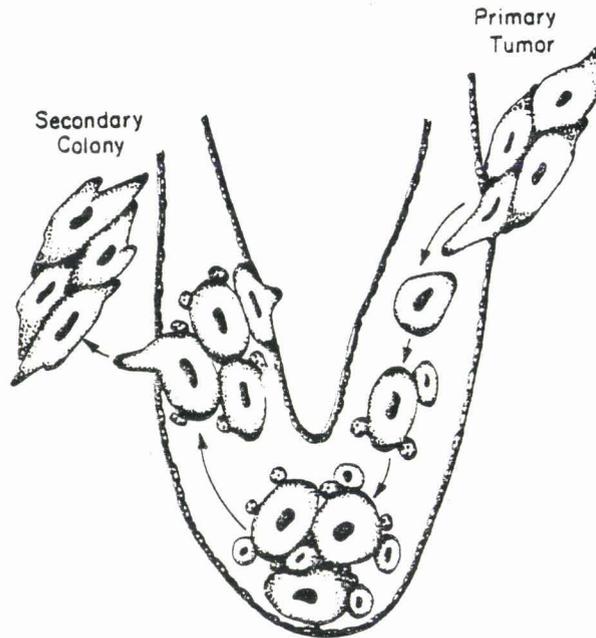


Figure 16 : Schéma du passage des cellules métastatiques dans la circulation. Noter les deux traversées de l'endothélium et l'aggrégation avec les cellules sanguines dans le capillaire représenté, (Raz & Ben-Ze'ev, 1987).

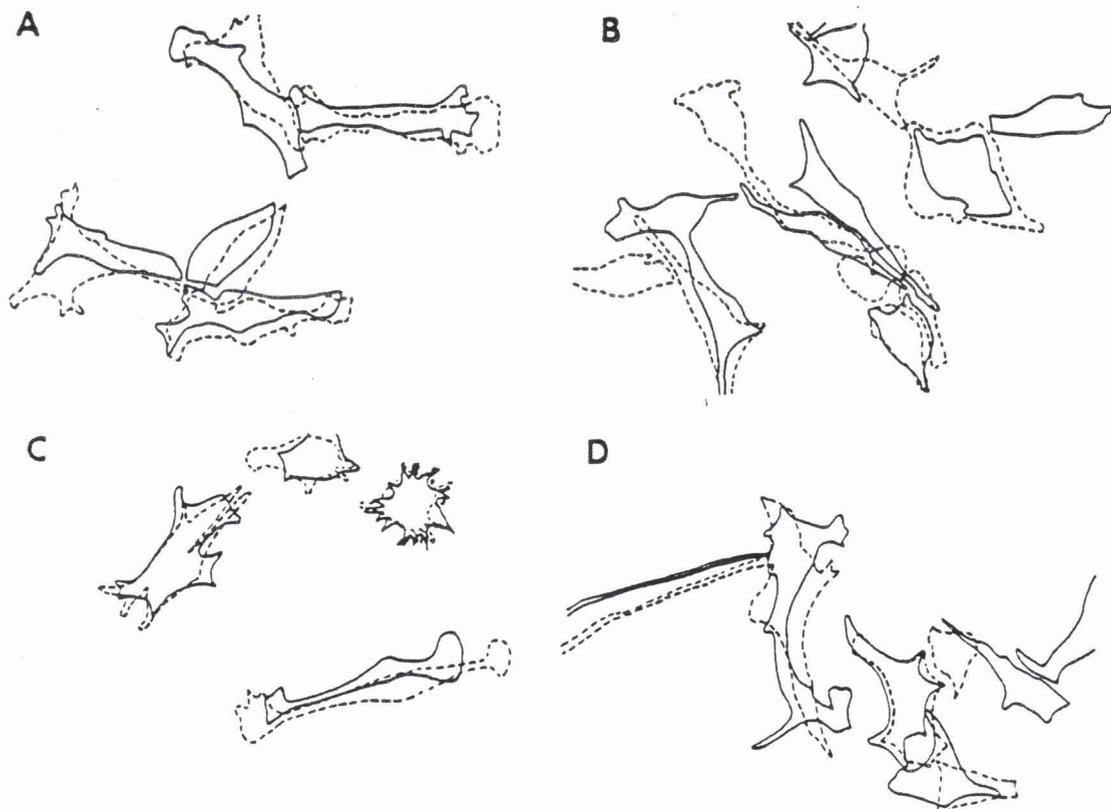


Figure 17 : Comparaison des mouvements de cellules faiblement (A, C) et fortement (B, D) métastatiques cultivées *in vitro* (Raz & Ben-Ze'ev, 1987).

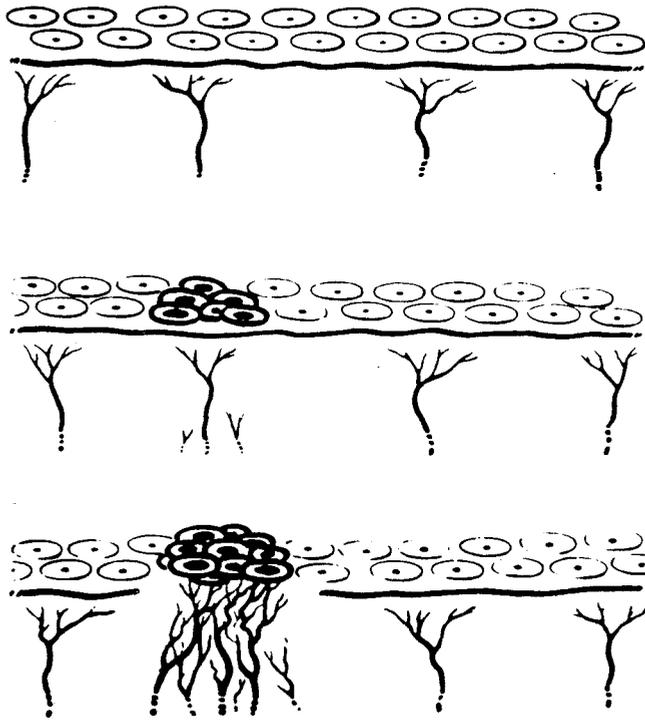


Figure 18: Hypothèse de Folkman sur la néovascularisation des tumeurs en croissance (Folkman, 1987).

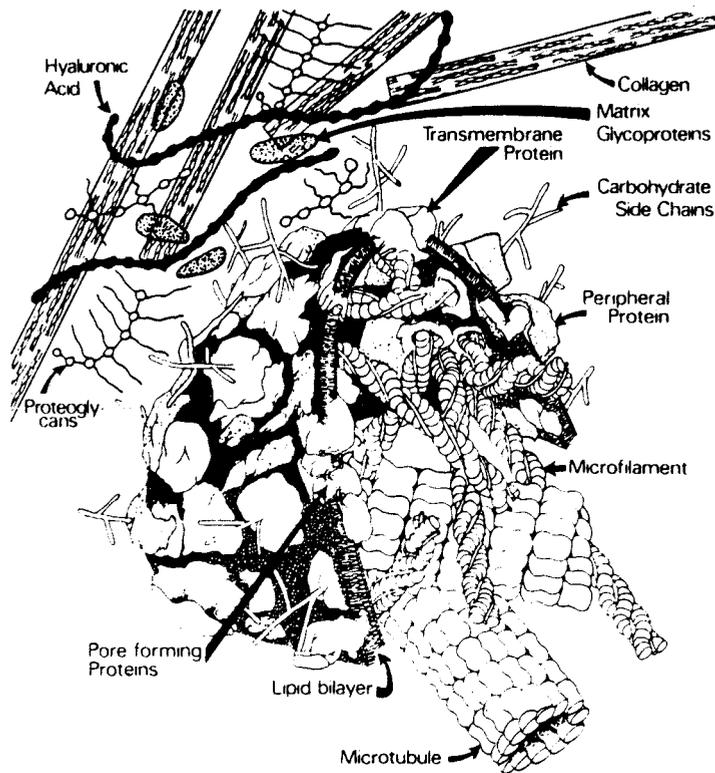


Figure 19 : La "surface" cellulaire d'après Aplin & Hughes, 1982. Les différents constituants du système sont dessinés approximativement à l'échelle.

des programmes du développement embryonnaire ; la similitude des mécanismes régissant la tumorigénicité avec ceux qui régulent le développement se profile à l'arrière-plan de ces rapprochements.

5. Transduction de signaux

Le rôle de la "surface cellulaire" (figure 19) en tant que médiateur des interactions cellulaires est actuellement admis. La cellule normale, comme la cellule cancéreuse, se sert de ce réseau moléculaire complexe pour répondre à des stimuli extérieurs et est ainsi capable de réagir à des signaux physiques ou chimiques par une action spécifique.

Les signaux mitotiques (ou régulateurs) en particulier sont véhiculés par des facteurs de croissance ou des hormones. Leur mode d'action fait intervenir des récepteurs spécifiques au niveau membranaire, ainsi qu'une série de réactions biochimiques à l'"étage organisateur" sous-jacent qu'est l'intérieur de la cellule. Les **seconds messagers** mis en œuvre peuvent être partagés en deux groupes fonctionnels :

- les messagers énergétiques, tel l'AMP cyclique, le GTP et les phospho-inositols (voir les revues de Berridge, 1987 et Nishizuka, 1988)
- les messagers à "intelligence moléculaire", tel le complexe de protéine-kinases (voir les revues de Hunter, 1987 et Berridge, 1987).

Ces deux groupes coopèrent dans l'interdépendance pour assurer le fonctionnement correct du système cellulaire. Par exemple, entre le moment où un signal mitotique traverse le "filtre" de la matrice extracellulaire et se fixe sur son récepteur et le moment où la cellule entre en division, la cascade de réactions biochimiques fait intervenir successivement la matrice extracellulaire, la membrane cellulaire, le cytosquelette, au moins un second messager, puis la transmission du signal mitotique au noyau qui, à son tour, engage et contrôle la mitose. Un signal mitotique aberrant ou une transduction aberrante d'un signal normal, suffisent parfois à induire des mitoses incontrôlées qui conduisent la cellule sur la voie de la transformation et du cancer.

Les oncogènes sont fortement impliqués dans la transduction des signaux, puisqu'un certain nombre d'entre eux spécifient des protéines membranaires qui ont des fonctions dans cette transduction. Le génome est, de toute évidence, un site préférentiel d'action des promoteurs tumoraux (Lerman *et al.*, 1986 ; Lerman *et al.*, 1987). Les esters de **phorbol** (voir Blumberg, 1988) qui entrent dans cette catégorie, sont responsables de l'activation de kinases intracellulaires (Nishizuka, 1988), mais aussi de la modification d'activités glycosyltransférases (Kiguchi *et al.*, 1986 ; Moskal *et al.*, 1987). Les esters de phorbol jouent à la fois un rôle dans la promotion tumorale et dans la transduction de signaux (Castagna, 1987). Les mécanismes biochimiques reliant ces différents phénomènes sont encore inconnus, mais l'intégration de l'ensemble de ces observations dans un schéma fonctionnel devient de plus en plus envisageable (Kellie, 1988).

Une autre classe de (glyco)protéines de surface à rôle capital dans la communication entre cellules, sont les canaux ioniques ou **ionophores** membranaires. Leur fonction dans le maintien des concentrations ioniques intracellulaires et du potentiel électrochimique transmembranaire est bien connue dans les systèmes musculaire et nerveux, mais presque inconnue dans la transformation cellulaire. Il est cependant facilement imaginable que les produits de certains

oncogènes spécifiant des GTPases ou des kinases (en relation par conséquent avec le métabolisme calcique intracellulaire) soient impliqués dans la modulation d'activités ionophorétiques. A titre d'exemple, le lecteur pourra se référer à une étude récente (Gaffrey *et al.*, 1987) indiquant que divers mitogènes ainsi que les oncogènes *c-Ha-ras*, *c-myc* et *v-erb B*, peuvent bloquer, après transfection, l'induction d'ionophores dépendants du voltage (canaux Ca^{++} , Na^+ , K^+) de myocytes en culture *in vitro*.

D'autre part, la motilité cellulaire accrue que l'on peut observer après transformation par l'oncogène *ras* (Varani *et al.*, 1986), fait intervenir les protéines contractiles du cytosquelette et donc le métabolisme calcique. De même, la régulation des signaux transmembranaires par la phosphorylation de récepteurs (revue de Sibley *et al.*, 1987) et le jeu des kinases (revue de Hunter, 1987) doit être en relation avec les mouvements des ions Ca^{++} .

Notons enfin qu'un effet cytotoxique accru de l'ouabaïne qui bloque l'ATPase Na/K-dépendante (pompe Na/K de la membrane plasmique) a été décrit sur des cellules NIH 3T3 transformées par l'oncogène *v-Ki-ras* (Tagliaferri *et al.*, 1987).

Les potentiels transmembranaires peuvent être considérés comme des outils de détection de tumeurs puisque des potentiels de plus en plus électronégatifs sont associés à des taux de prolifération de plus en plus faibles (Niemtzow, 1987).

E. LE PHENOTYPE MALIN

1. Marqueurs tumoraux de nature oligosaccharidique

a. Les antigènes oncofœtaux

Les programmes génétiques régissant le développement embryonnaire comportent des régulations précises de l'expression d'oligosaccharides. L'antigène SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen), dont la structure s'écrit $Gal(\beta 1-4)[Fuc(\alpha 1-3)]GlcNAc$ (Solter & Knowles, 1978), est capable d'inhiber la compaction embryonnaire, ce qui suggère l'intervention de cette structure dans les interactions cellule-cellule ou/et cellule-substrat.

D'autres déterminants antigéniques exprimés lors de l'embryogenèse possèdent une distribution très limitée chez l'adulte. C'est le cas, par exemple, des antigènes glycolipidiques de type Le^a et Le^x (voir la revue de Hakomori & Kannagi, 1983) qui se trouvent ré-exprimés dans certains cancers malins. De même, des antigènes de groupe sanguin du système ABH ont été retrouvés modifiés dans des cas de carcinomes colorectaux (revue de Hakomori, 1984).

Ces aberrations suggèrent que l'expression de ces structures reflète le déroulement d'un programme embryonnaire (Feizi, 1985), remis en route lors de la dérive maligne.

b. Multi-antennarisation des glycanes

Les travaux entrepris dans notre laboratoire (Debray *et al.*, 1983) sur les cellules BHK et sur leurs homologues transformées par le virus du sarcome du Hamster (cellules BHK/HSV) ont

montré une augmentation du nombre d'antennes sur les glycanes des N-glycosylprotéines membranaires des cellules transformées par rapport aux glycanes des cellules BHK de référence, d'après le comportement de ces glycanes en chromatographie d'affinité sur la ConA immobilisée. Ces différences ont été retrouvées sur les glycanes des fibronectines sécrétées par ces mêmes cellules (Delannoy *et al.*, 1985), ce qui permet de penser que les systèmes glycosyltransférasiques de la cellule sont affectés dans leur ensemble par la transformation virale.

La multi-antennarisation a par ailleurs été retrouvée sur des cellules BHK transformées par le virus du polyome (Yamashita *et al.*, 1984), sur des lignées transformées de cellules uroépithéliales humaines (Debray *et al.*, 1986), sur des cellules BHK transformées par le RSV qui contient l'oncogène *src* (Pierce & Arango, 1986), sur des fibroblastes Nil-8 transformés par le virus du sarcome du Hamster (Hubbard, 1987) ou encore des fibroblastes NIH 3T3 rendus métastatiques *in vivo* après transformation par l'oncogène *c-Ha-ras* activé (Cazlaris *et al.*, 1988 soumis, voir le Chapitre III "Résultats") ainsi que sur des cellules BHK transformées par ce même oncogène (voir également le Chapitre III "Résultats").

Dans un élégant travail, (Dennis *et al.*, 1987) la corrélation négative de ce phénomène a été montrée : des mutants lectine-résistants qui ont perdu leur capacité métastatique *in vivo*, avaient aussi perdu l'activité N-acétylglucosaminyltransférase V (GnT V), responsable de la formation de l'antenne liée en β 1-6 au résidu de Man α 1-6 sur les glycanes de type N-acétyllactosaminique.

En conclusion de ces différents travaux, nous pouvons considérer l'antennarisation en β 1-6 comme un marqueur métastatique.

Un troisième groupe d'études consiste à tenter de bloquer par "voie chimique" l'expression des glycosyltransférases. Ainsi l'activité GnT V est inhibée par un accepteur synthétique (Pierce *et al.*, 1987), ce qui provoque une chute du potentiel métastatique *in vivo*.

Les inhibiteurs de la N-glycosylation, telle la castanospermine (qui bloque les α -glucosidases du "trimming"), la swainsonine (qui bloque la mannosidase II) ou la tunicamycine (qui bloque à son premier stade la formation du Dol-PP-oligosaccharide) ont été utilisés par différents auteurs (Humphries *et al.*, 1986; 1986a) pour inhiber la colonisation pulmonaire par des cellules de mélanome murin traitées. Les travaux sur ce modèle ont commencé dès le début des années 1980 avec l'équipe de Nicolson (Irimura *et al.*, 1981).

La swainsonine augmente l'activité des cellules NK (Natural Killer) agissant ainsi comme un immunomodulateur (voir le paragraphe 2. ci-dessous) antimétastatique (Humphries *et al.*, 1988). De même, le traitement par la swainsonine provoque la chute du potentiel métastatique *in vivo* (Dennis, 1986a) et la perte du phénotype transformé (De Santis *et al.*, 1987). Dans cette dernière étude, la question est posée de savoir si le phénotype transformé est directement affecté par la glycosylation du produit de l'oncogène. En effet, ceci est suggéré par des travaux portant sur l'inhibition de la glycosylation par la castanospermine, altérant la transformation par l'oncogène *fms* (Nichols *et al.*, 1985 ; Hadwiger *et al.*, 1986). En revanche, De Santis *et al.* soulignent que le produit de *ras* n'est pas glycosylé, mais que ce fait n'empêche pas la perte du phénotype transformé après traitement par la swainsonine. Dans une étude encore plus récente sur ce point (Nichols *et al.*, 1987), la réversion du phénotype transformé, après traitement par la castanospermine, est quasi-totale en ce qui concerne le cytosquelette, la surface cellulaire, l'inhibition de contact, voire le métabolisme du glucose.

c. Acides sialiques

Le rôle de la sialylation dans la métastase reste controversé (voir les revues de Nicolson, 1982; Schirmacher *et al.*, 1982). Une preuve de l'implication directe de l'acide sialique dans la métastase a été apportée par Yogeewaran (Yogeewaran & Salk, 1981 ; Yogeewaran *et al.*, 1978) s'appuyant sur l'observation (Weiss, 1974) que le traitement par la neuraminidase affectait la distribution *in vivo* de cellules métastatiques. L'implication de la sialylation de la surface cellulaire dans le potentiel invasif et métastatique d'hybridomes de lymphocytes T a été récemment décrite par (Collard *et al.*, 1986).

Par ailleurs, des variants cellulaires du mélanome B16, résistants à la WGA et qui présentent une tumorigénicité réduite ont été décrits (Pinnaduwege *et al.*, 1981). Une autre étude (Altevogt *et al.*, 1983) a permis de mettre en évidence des différences de fixation de diverses lectines sur l'acide sialique de la surface cellulaire de lignées à potentiel métastatique variable, indiquant que les modifications de la sialylation sont corrélées à la progression tumorale.

Enfin, des résultats obtenus dans notre laboratoire montrent une corrélation directe de la sialylation avec la malignité. Nous avons pu observer (voir Chapitre III : "Résultats") une nette augmentation de l'activité sialyltransférase des cellules NIH 3T3 et BHK à la suite de la transformation par l'oncogène *ras* activé.

d. Fucose périphérique et osamine intercalaire

Le fucose remplaçant l'acide sialique en position terminale non réductrice des glycanes peut être considéré comme un marqueur tumoral (malheureusement non universel) à la lumière des travaux (Finne *et al.*, 1982) rapportant une augmentation de l'activité fucosyltransférase dans des cellules de mélanome.

Une autre étude menée par le groupe de Kobata, portant sur les glycanes de la γ -glutamyl-transpeptidase de sujets cancéreux a montré l'apparition d'un résidu de GlcNAc "intercalaire" (voir la revue de Kobata, 1987), qu'il est possible de considérer comme un marqueur tumoral.

e. Autres marqueurs - Conclusion

D'autres structures glycaniques aberrantes ou modifiées ont été découvertes, notamment :

- sur des glycohormones de patients cancéreux (voir également la revue de Kobata citée ci-dessus sur les travaux de son groupe concernant l'hCG),
- sur des glycanes de O-glycosylprotéines. A titre d'exemple, se reporter aux travaux de Redini *et al.*, 1987 ; Codington *et al.*, 1986 ; Steck *et al.*, 1987 et la revue de Nigam *et al.*, 1982,
- sur les glycolipides (Laferté *et al.*, 1987 ; Nudelman *et al.*, 1983 et revues de Hakomori déjà citées).

Nous concluons en précisant que les modifications glycaniques associées à la transformation cellulaire peuvent faire l'objet d'un long "catalogue" de structures, que nous avons tenu à éviter. Nous avons préféré nous en tenir aux quelques marqueurs décrits jusqu'ici, en

renvoyant le lecteur à la bibliographie pour des détails supplémentaires et notamment aux revues suivantes : Warren *et al.*, 1978 ; Nicolson, 1982 ; Turner, 1982 ; Hakomori & Kannagi, 1983 ; Smets & Van Beek 1984 ; Hakomori 1985 ; Hakomori 1986 ; Dennis & Laferté, 1987 ; Raz *et al.*, 1980.

2. Développement du phénotype malin *in vivo*

a. Etapas de la métastase

Après une première activation, la cellule se transforme, entre en division et forme une tumeur primaire. Des cellules de cette tumeur, probablement modifiées par une seconde activation, quittent ce site, s'infiltrant dans les vaisseaux et transitent dans la circulation, jusqu'à ce qu'elles trouvent un site secondaire. Elles s'y implantent et y prolifèrent, en formant des tumeurs secondaires. Elles peuvent s'en détacher à nouveau pour former des métastases secondaires. Les oncogènes et les glycoconjugués de surface sont impliqués dans ce processus à différents niveaux.

b. Surveillance immune

Les cellules métastatiques sont constamment au contact de cellules immunocompétentes pendant leur transit dans la circulation. Ce transit peut durer plusieurs années, comme le montre l'observation clinique. En effet, une tumeur enlevée par chirurgie peut donner des métastases longtemps après. Ceci pose le problème de la **surveillance immune** (Burnet, 1964 ; Burnet, 1970). Les cellules métastatiques se montrent capables d'échapper aux macrophages et aux autres cellules cytotoxiques mais il est probable que le système immunitaire soit bien actif et que les cellules qui "réussissent" à y échapper pour former des métastases soient, en fait, issues d'une sévère sélection. Les cellules tumorales sont probablement détruites en grande majorité et les métastases observées correspondent au "sommet émergé de l'iceberg". Fidler a décrit les cellules métastatiques comme des "champions du décathlon *in vivo*" (Fidler, 1978).

Une explication possible de ce phénomène serait que les antigènes foetaux de différenciation, ré-exprimés en cas de cancer (voir par exemple Escribano *et al.*, 1986), ne sont pas reconnus comme du "non-soi" par les cellules immunitaires.

De nombreux travaux portent sur l'implication et le comportement du système immunitaire dans la prévention naturelle de la métastase. Le foie est un organe où la destruction des cellules tumorales est active (Malter *et al.*, 1986). Le rein semble jouer aussi un rôle (Weiss *et al.*, 1986). Des macrophages dits "intratumoraux" ont été détectés à proximité des tumeurs (Bugelski *et al.*, 1987 ; revue de Mc Bride, 1986), ce qui semble indiquer que les cellules cancéreuses sont bien immunogènes (voir la revue d'Ashman, 1987). En effet, un "réseau immunitaire" est formé pour rejeter les tumeurs (Evans, 1986).

Les cellules NK ont également un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale et la métastase (Hanna, 1985), de même que les plaquettes (Honn *et al.*, 1987). L'activité NK semble être inhibée par une sialylation accrue (Van Rinsum *et al.*, 1986) ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, la survie de certains clones tumoraux présentant une hypersialylation de surface.

Une explication directe de l'effet bénéfique d'immunostimulants dans la thérapeutique est fournie par les travaux montrant une régulation de la prolifération cellulaire par l'interféron (Kulesh & Greene, 1986).

D'autre part, les prostaglandines ont un effet sur le contrôle de la métastase (Fulton, 1987).

Notons enfin que la clonalité des tumeurs est discutée. Si des cellules isolées parviennent à coloniser un site et à y proliférer, il est logique de considérer les tumeurs métastatiques comme des "clones" cellulaires (Iannaccone *et al.*, 1987). En revanche, la clonalité n'est pas retrouvée au plan immunologique (Fidler, 1978a ; Fidler *et al.*, 1978) et les tumeurs apparaissent donc hétérogènes.

3. Conclusion

La biologie de la métastase est un vaste sujet sur lequel la bibliographie est surabondante et il nous paraît déplacé de tenter de le passer complètement en revue. Nous renvoyons par conséquent le lecteur à la bibliographie et notamment aux revues suivantes :

Fidler, 1978 et 1978a ; Fidler *et al.*, 1978 ; Poste & Fidler, 1980 ; Raz *et al.*, 1980 ; Warren, 1980 ; Sugarbaker, 1981 ; Nicolson, 1982 ; Hagmar *et al.*, 1984 ; Klein & Klein, 1985 ; Tarin, 1985 ; Spandidos, 1986 ; Tachibana & Yoshida, 1986 ; Dennis & Laferté, 1987 ; Gabius, 1987 ; Nicolson, 1987 et 1987a.

Notons pour conclure que le "phénotype malin" est à considérer comme un "état cellulaire" accessible par différentes voies fonctionnelles (activation d'oncogènes, absence de modulation de la cancérogenèse multi-étapes, dérèglements de la surveillance immune...).

L'expression d'antigènes tumoraux de nature oligosaccharidique pourrait bien être une des causes de l'essaimage métastatique des cellules tumorales en faisant intervenir des mécanismes de reconnaissance spécifique par des lectines membranaires au niveau du site secondaire. Une des voies qui permettent de confirmer cette thèse est la recherche de nouvelles structures glycaniques spécifiquement altérées par la transformation maligne. Cette démarche sera exposée dans le paragraphe "Stratégies de recherches" ci-dessous où seront également présentés les modèles expérimentaux choisis au cours de notre travail.

F. STRATEGIE DE RECHERCHES - CONCLUSION

1. Approches thérapeutiques

Diverses approches à but thérapeutique ont été entreprises, qui font appel à des méthodes immunologiques et qui visent à empêcher la fixation des cellules métastatiques sur le site secondaire en masquant les marqueurs qu'elles portent à l'aide d'anticorps monoclonaux. Par exemple il est possible d'inhiber la colonisation pulmonaire par des cellules de mélanome B16 (Herd, 1987) et des anticorps monoclonaux ont été dressés contre l'antigène 17-1A de cellules épithéliales (Göttlinger *et al.*, 1986).

Une autre stratégie consiste à éliminer spécifiquement les cellules tumorales, voire

métastatiques, par la technique du **ciblage de drogues** antimitotiques. Cette approche fait intervenir l'emploi de **néoglycoprotéines** (glycoprotéines synthétisées partiellement *in vitro*, contenant un glycanne reconnu par les lectines membranaires tumorales et une drogue cytotoxique, ou d'anticorps spécifiques auxquels sont conjugués les agents antitumoraux). Le traitement de cellules par ce type de glycoconjugués fait intervenir alors la "surface" cellulaire et les mécanismes d'**endocytose** (voir Pearse, 1987) ; le conjugué est internalisé et la drogue libérée dans la cellule où elle peut exercer sa fonction cytotoxique (voir, à titre d'exemple, Gabius *et al.*, 1987).

Ces stratégies connaissent des échecs (Embleton *et al.*, 1986) et ne sont donc pas généralisables. Elles n'en sont pas moins prometteuses, sachant qu'elles se trouvent encore à leurs débuts. A ce titre, seule la recherche de marqueurs de surface spécifiques de la cellule transformée ou maligne, pourrait apporter des avancées précieuses dans ce domaine.

Nos recherches s'inscrivent également dans ce cadre. En effet, s'il est important de comprendre l'effet de la transformation par les oncogènes sur la "surface" cellulaire au plan fondamental, ces recherches pourront trouver, à terme, une application clinique dans l'hypothèse où des marqueurs nouveaux étaient découverts.

Enfin, notons le développement d'une **approche immunothérapeutique** à l'aide de cytokines immunostimulantes comme l'interféron- γ , l'interleukine-2, le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) ou le CSF (Talmadge & Black, 1988). Les auteurs soulignent que cette approche pose des problèmes lors de la transposition des résultats, obtenus chez l'animal, en pratique clinique.

2. Modèles expérimentaux

Dans notre laboratoire, la recherche de nouveaux marqueurs de nature oligosaccharidique a commencé depuis plusieurs années, sous l'impulsion du Professeur J. Montreuil. Différents modèles expérimentaux ont été utilisés :

a. Modèle BHK - BHK/HSV

Les cellules **BHK** sont des fibroblastes de rein de Hamster syrien nouveau-né (*Mesocricetus aureatus*), établies en lignée (BHK 21) depuis 1961 (MacPherson & Stoker, 1962). Le clonage à partir de cellules isolées a fourni le clone 13 qui fut isolé un an plus tard (MacPherson, 1963) et déposé à l'ATCC (CCL 10). Dans les travaux rapportant l'établissement d'une lignée dérivée, transformée par le virus du polyome (MacPherson, 1963 ; Montagnier & MacPherson, 1964), la lignée-mère **BHK 21/13** est décrite comme une **souche incapable de former des clones en agar et non transformée**.

Les cellules **BHK/HSV** sont des cellules BHK transformées par le virus du sarcome du Hamster (Zavada & MacPherson, 1970), morphologiquement très différentes des cellules BHK et tumorigènes chez le Hamster.

Des études comparées de la glycosylation de ces deux types cellulaires ont été menées au laboratoire (Debray *et al.*, 1983 ; Delannoy *et al.*, 1985). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la multi-antennarisation des glycanes membranaires liés à l'asparagine chez la cellule

transformée, ainsi que des glycanes des fibronectines relâchées dans le milieu de culture par ces mêmes cellules (voir la revue de Montreuil, 1987).

Nous avons entrepris de caractériser des structures glycaniques de ces cellules (voir Chapitre III).

b. Le carcinome pulmonaire de Lewis

Ce carcinome, métastatique au poumon, a été découvert par Margaret R. Lewis, en 1951, chez la Souris C57BL/6. Une lignée dérivée (Dus *et al.*, 1985) de ce carcinome (cellules LL₂) a été étudiée au laboratoire. Sur la base d'une approche visant à sélectionner des sous-populations cellulaires *in vitro* par la résistance à des lectines (Kerbel *et al.*, 1982), des variants lectine-résistants de ces cellules ont été sélectionnés (Debray *et al.*, soumis, cf. Debray, 1989) qui possèdent des potentialités métastatiques différentes de celles de la cellule de référence.

La caractérisation des glycoconjugués membranaires de ces variants a été entreprise par H. Debray au laboratoire, en collaboration avec le groupe qui a isolé les cellules LL₂ (Debray, 1989). Lors de notre stage de D.E.A. (Cazlaris, 1986), nous avons participé à l'isolement et à l'étude des structures glycaniques exprimées par les cellules LL₂ ainsi que par un variant résistant à la WGA qui présente un potentiel métastatique réduit.

c. Le modèle des cellules uroépithéliales humaines

En collaboration avec le groupe polonais ci-dessus et un groupe danois, H. Debray (Debray *et al.*, 1986) a pu mettre en évidence la multi-antennarisation des glycanes liés à l'asparagine dans différentes lignées de cellules uroépithéliales humaines.

d. Nouveau modèle

Nous avons introduit au laboratoire un nouveau modèle qui fait appel à la transformation cellulaire par **transfection d'oncogènes**. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Professeur D. Stéhelin, à l'Institut Pasteur de Lille.

Notre choix s'est porté sur les fibroblastes murins NIH 3T3 (Jainchill *et al.*, 1969), transformés par l'oncogène humain **c-Ha-ras** EJ. Nous avons également transfecté ce gène dans les cellules BHK 21/C13, ce qui nous permet de comparer plusieurs systèmes de paramètres :

- L'effet de l'expression de l'oncogène *ras* activé sur la glycosylation membranaire dans deux modèles cellulaires différents (BHK 21/C13 et NIH 3T3).

- L'effet global de la "transformation" sur cette glycosylation, puisque nous avons mené cette même étude structurale en parallèle sur les cellules BHK/HSV (transformation virale) et BHK *ras* (transformation par l'oncogène activé).

Les trois paragraphes suivants portent sur notre stratégie de recherches. Les choix concernant l'oncogène et la méthode employée y sont exposés.

3. Choix de l'oncogène *ras*

La famille *ras* est une famille d'oncogènes spécifiant *in vivo* des "protéines G" (capables de fixer le GTP et présentant une activité GTPase) à localisation membranaire. Ils sont retrouvés dans un grand nombre de cancers humains notamment les cancers de la vessie, du côlon et du rectum (voir la revue de Barbacid, 1987).

La famille d'oncogènes de loin la mieux connue (voir la revue de Barbacid ci-dessus), ces gènes ont été découverts dans les années 1960 (Harvey, 1964 ; Kirsten & Mayer, 1967) et identifiés comme des gènes responsables de l'induction virale de sarcomes chez le Rat (d'où leur nom, tiré de *rat sarcoma virus*).

Ils ont été "re"-découverts et identifiés comme des oncogènes en 1982-1983 (Chang *et al.*, 1982 ; Der *et al.*, 1982 ; Parada *et al.*, 1982 ; Tabin *et al.*, 1982 ; Shimizu *et al.*, 1983 ; Taparowski *et al.*, 1983). Leur rôle dans la transformation cellulaire *in vitro* et dans la métastase *in vivo* est établi, à l'heure actuelle (voir la revue de Barbacid, 1987 ainsi que Takahashi *et al.*, 1986 ; Kris *et al.*, 1985 ; Blomhoff *et al.*, 1987 ; Stacey, 1988 et Waghorne *et al.*, 1987).

Les protéines (p21^{ras}) spécifiées par ces gènes (voir De Vos *et al.*, 1988 ; Jurnak, 1988) sont retrouvées dans les tissus humains normaux (Furth *et al.*, 1987). Ces protéines, micro-injectées dans la cellule, provoquent la transformation (Stacey & Kung, 1984) et une augmentation du pH intracellulaire (Hagag *et al.*, 1987). Elles induisent l'expression d'un autre oncogène, *c-fos* (Stacey *et al.*, 1987), lui-même responsable de l'augmentation des potentialités métastatiques (Taniguchi *et al.*, 1986), précisant ainsi le rôle de *ras* dans la métastase.

Les effets du gène *ras* sur les cellules NIH 3T3 (Tableau II) ont été étudiés *in extenso* par différents groupes. Un effet synergique "adénovirus-*ras*" a été découvert (Katz & Carter, 1986). Par ailleurs, l'expression de *ras* est corrélée directement à une acquisition de potentialités métastatiques (Egan *et al.*, 1987 ; Egan *et al.*, 1987a ; Bernstein & Weinberg, 1985 ; Bradley *et al.*, 1986 ; Greig *et al.*, 1985 ; Katz & Carter, 1986 ; Collard *et al.*, 1987 ; Thorgeirsson *et al.*, 1985 ; voir aussi les revues de Barbacid, 1987 et de Chambers & Tuck, 1988).

En revanche, la corrélation de cette dérive maligne avec des modifications précises de la glycosylation n'a été rapportée, à notre connaissance, que dans trois cas :

- par Santer *et al.*, 1984 qui furent les premiers à décrire des modifications affectant les N-glycosylprotéines membranaires après transfection de *ras* dans les cellules NIH 3T3,
- par Matyas *et al.*, 1987 qui ont détecté des modifications des glycolipides dans ce même système,

- et, plus récemment, par Bolscher *et al.*, 1988 qui rapportent l'effet de *ras* sur la glycosylation de deux protéines cellulaires : la protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculaire et l'antigène d'histocompatibilité de classe I. Les auteurs démontrent que la glycosylation est altérée avant même l'apparition du phénotype transformé, ce qui permet de penser que l'effet de *ras* est très précoce et s'exerce à la base du processus de glycosylation.

Nos travaux s'inscrivent dans ce cadre. Nous avons choisi ce même système (cellules NIH 3T3 transformées par transfection d'un gène *ras* activé) de manière à nous placer dans des conditions permettant de comparer nos résultats à ceux déjà décrits dans la littérature. Nous avons choisi d'approfondir ce point en étudiant l'activité sialyltransférase de nos cellules (voir Chapitre

Tableau II : Effets cellulaires de l'oncogène *ras* (Chambers & Tuck, 1988)

In vitro transformation properties
(e.g. focus formation, growth in soft agar)
Tumorigenicity
Motility
Invasiveness
“Experimental” metastatic ability
“Spontaneous” metastatic ability
Altered cytoskeletal structures
Altered membrane glycoproteins
Altered phospholipid biochemistry
Altered polyamine biosynthetic pathways
Increased radiation resistance
Increased type IV collagenase activity
Increased plasminogen activator activity
Increased secretion of growth factors
Increased susceptibility to NK cytotoxicity
Increased expression of other oncogenes
(e.g. *c-abl*, *c-fos*)

III) ainsi que les structures des glycanes exprimés par celles-ci.

4. Choix de la méthode de transformation

La transformation *in vitro* par **transfection** (méthode au co-précipité DNA-phosphate de calcium de Graham & Van der Eb, 1973) nous a semblé être la façon la plus judicieuse d'opérer. En effet, une étude récente (Kerbel *et al.*, 1987) suggère que cette méthode d'introduction du gène dans la cellule affecte les potentialités métastatiques des clones transformés. Aussi avons nous estimé qu'il n'était pas souhaitable de nous écarter, sur un point aussi important, de la pratique la plus classique dans le domaine. Nous avons préféré vérifier la non-incidence de cette méthode sur notre modèle.

Ainsi, les plasmides **pSV2neo** (Southern & Berg, 1982), qui apporte la résistance à la néomycine et **pSV2neo EJ** (Tabin *et al.*, 1982), qui contient le même gène de résistance flanqué de l'oncogène c-Ha-ras activé, ont été introduits par transfection dans les cellules réceptrices BHK 21/C13 et NIH 3T3, la transfection de **pSV2neo** servant de témoin pour cette méthode. Nous reviendrons sur ce point plus en détail dans la troisième partie de ce mémoire consacrée aux résultats de nos travaux. Nous devons cependant préciser, d'ores et déjà, que cette transfection "à blanc" nous a fourni des cellules **non tumorigènes** *in vivo* pour ce qui est de la série NIH.

5. Choix de modèles animaux

Nous avons choisi de travailler dans des conditions de greffe homologue et hétérologue par rapport à l'origine des cellules transformées dans le but d'évaluer leurs capacités tumorigène et métastatique. Les techniques d'étude du comportement des cellules transformées après greffe *in vivo* étant au point depuis longtemps (voir Kahn & Shin, 1979) mais évoluant encore (Naomoto *et al.*, 1987), nous ne nous étendons pas sur ce point. Nous renvoyons le lecteur aux excellentes revues de Fidler (Fidler, 1978a et 1986), notamment sur l'utilisation de **Souris athymiques "nude"**.

Ce modèle présente l'avantage d'éviter l'interférence des cellules étudiées avec les réactions immunitaires de l'animal récepteur, normalement responsables de la destruction d'un grand nombre de cellules tumorales. Ces animaux sont **immunodéprimés** et doivent donc être maintenus à l'abri de tout germe pathogène (voir "Matériel et Méthodes").

Dans la mesure où les greffes hétérologues fournissent parfois peu de renseignements, nous avons dû nous placer en système homologue pour l'étude du comportement *in vivo* des cellules de Hamster. Dans ce but et pour des raisons de corrélation, nous avons utilisé des Hamsters normaux provenant du Centre d'Élevage de l'Institut Pasteur de Lille.

Nous reviendrons plus en détail sur ces points dans les chapitres suivants.

6. Méthodologie biochimique

Les techniques employées pour l'isolement, le fractionnement et l'analyse des glycoconjugués, les analyses génétiques et la détermination des activités enzymatiques seront exposées dans les chapitres suivants.

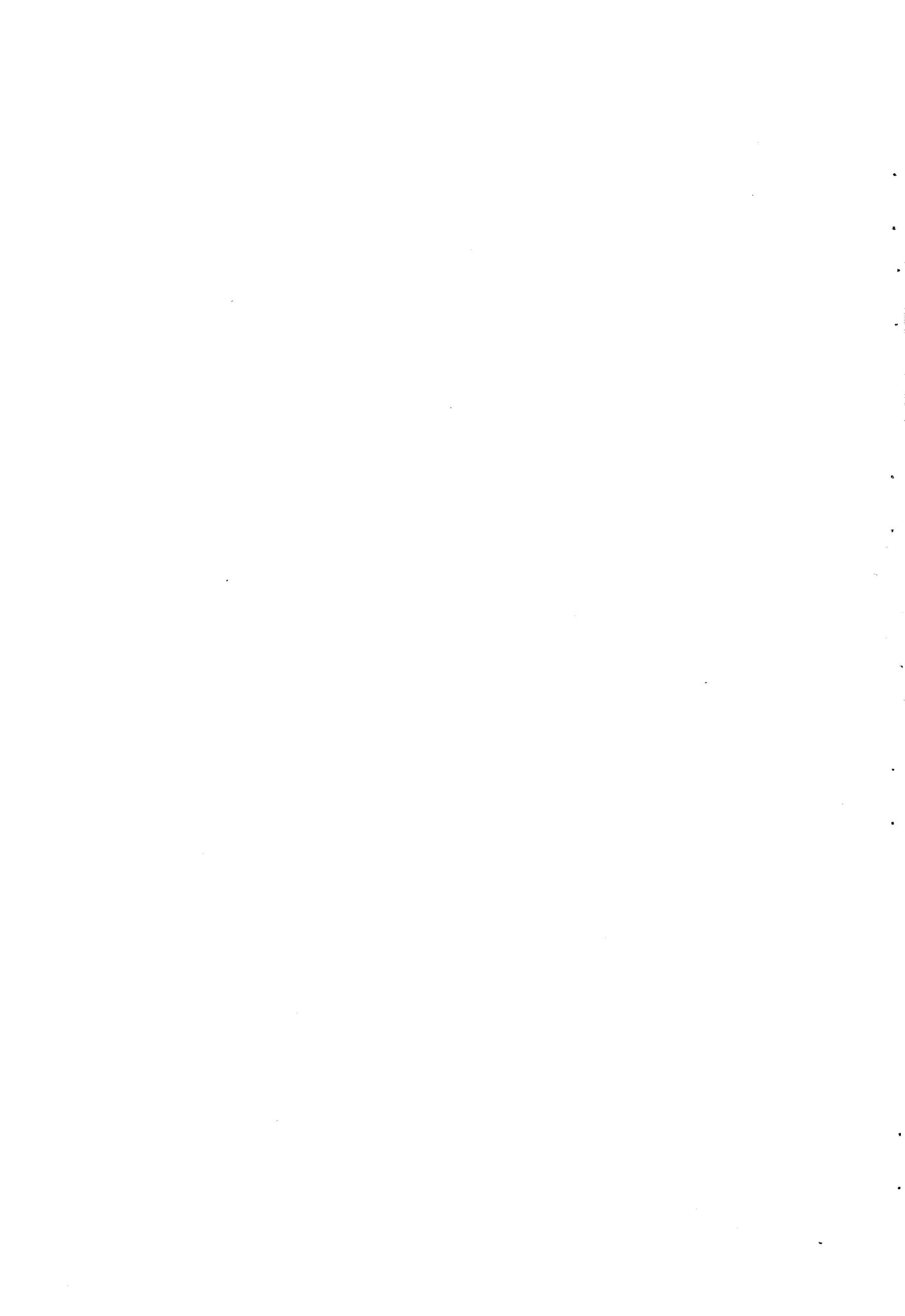
7. Conclusion

Nous avons le sentiment qu'il n'existe probablement pas de marqueur de nature oligosaccharidique qualitatif et universel, caractéristique de l'état malin ; les résultats obtenus de par le monde au cours de ces dix dernières années de recherches suggèrent que les différences observées entre les cellules normales et les cellules transformées sont plutôt de nature quantitative, les marqueurs de la surface cellulaire étant, en fait, des structures sur-exprimées par la cellule transformée ou des structures embryonnaires ré-exprimées.

Cependant, dix années de recherches ne suffisent pas à éradiquer une maladie "ancestrale" et l'obstination des chercheurs dans ce domaine est significative. Toute variation caractéristique de la malignité, même apparemment mineure, peut déboucher sur une forme thérapeutique.

La découverte récente des oncogènes et de leur implication dans la progression tumorale et la métastase ont ouvert, depuis quatre à cinq ans, de nouvelles perspectives, dont nos recherches se sont inspirées. L'avenir seul dira si cette voie aura été la bonne.

Pour conclure, citons une phrase de J.M. Bishop (1987) : "*[as] the genome of the cancer cell is better understood, we hope to acquire new devices for the prevention, diagnosis and therapy of cancer ; and we may eventually achieve an even grander goal, to grasp the designs that order the lives of our cells.*"



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A. MILIEUX ET SOLUTIONS POUR LA CULTURE CELLULAIRE

1. Milieu D 10 FCS

On ajoute au milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) préparé par lots de 10 l, du bicarbonate de sodium (2 g/l), 3 ml HCl 7,2 N (Merck) amenant le pH à 7,4, une ampoule de Gentamycine injectable (Gentalline Unilabo, 80 mg), 50 mg de Fungizone (Amphotéricine B, Squibb), 1% des acides aminés non essentiels de Eagle (Eurobio MEM NA 00 solution) et 10 mg de biotine (Sigma). Le milieu est stérilisé par filtration sur membrane Durapore (Millipore ; 0,22 μ m) et partagé en flacons de 1 l, conservés à 4°C. Au moment de l'utilisation, on ajoute 10 % (v:v) de sérum de veau fœtal (Fetal Calf Serum, Gibco) décomplémenté par chauffage à 50°C pendant 45 min, pour obtenir le milieu de culture D 10 FCS. Entre chaque prélèvement, le milieu est conservé à 4°C. Les flacons entamés depuis plus de 15 jours sont éliminés.

2. Solution VT (Versène-Trypsine)

A 10 litres de Versène (EDTA 12,5 g NaCl 80 g KCl 2 g Na₂HPO₄·12 H₂O 28,7 g K₂HPO₄ 2g NaOH 1 N 10 ml H₂O q.s.p. 10 l) stérile, on ajoute 10 g de trypsine (Difco 1/250), 10 ml d'une solution de NaOH 1 N stérile, 1 ampoule de Gentalline (Unilabo, 80 mg), 25 mg de Fungizone (Squibb) et 2 ml de solution aqueuse stérile de rouge de phénol à 1% (p : v). La solution est stérilisée par filtration (voir ci-dessus) et partagée en flacons de 250 ml conservés à 4°C pendant un mois au maximum.

3. Milieu de congélation

Il est préparé extemporanément en ajoutant 2 ml de sérum de veau fœtal et 1 ml de DMSO stérile à 7 ml de milieu D 10 FCS.

B. SOLUTIONS-TAMPONS POUR LA CHROMATOGRAPHIE

1. Tampons destinés à la chromatographie d'affinité sur ConA immobilisée (tampons ConA)

La composition de la solution-mère de tampon est la suivante : acétate de sodium 50 mM NaCl 1 M MgCl₂ CaCl₂ 10 mM NaN₃ 0,2 % (Merck). La solution est ajustée à pH 5,2 avec HCl et conservée à la température ambiante. Au moment de l'utilisation, à la solution-mère diluée au dixième, on ajoute du chlorure de manganèse pour obtenir une concentration finale de 1 mM et on ajuste le pH à 5,2.

Les tampons d'élution sont préparés en dissolvant dans la solution précédente le glucoside (méthyl α -D-glucopyranoside, Sigma) jusqu'à la concentration finale désirée (0,01 M, 0,3 M ou 0,5 M). Ces tampons d'élution sont conservés à température ambiante.

2. Tampon PBS

Solution de phosphate (Na_2HPO_4 1 g/l, NaH_2PO_4 0,437 g/l) NaCl 9 g/l NaN_3 0,02 % (Merck), de pH 7,4, préparé sous forme de concentré à diluer au dixième au moment de l'utilisation.

Le tampon d'élution employé en chromatographie d'affinité sur colonne de LCA immobilisée est préparé en dissolvant le glucoside à la concentration 0,15 M dans le tampon PBS dilué.

3. Tampon AcA

Solution de Tris (hydroxyméthyl-amino méthane) 0,05 M NaCl 0,17 M NaN_3 0,02 % (Merck) de pH 7,4 (HCl).

* Remarque : La stérilisation systématique de toutes ces solutions par filtration sur membrane Millipore (porosité de 0,22 μm), l'addition d'azide de sodium et la conservation dans des flacons de verre brun permettent d'éviter le développement de micro-organismes.

C. ANIMAUX

La capacité tumorigène et métastatique des cellules étudiées a été évaluée *in vivo* sur des animaux de laboratoire.

Nous avons employé des Souris athymiques femelles Balb C nu/nu (Iffa-Credo, Grenoble) âgées de 6 semaines. Dès réception, les souris sont placées sous atmosphère stérile en isolateur, par groupes de 5 au maximum par cage et gardées en observation pendant 3 à 4 jours, avant de procéder à l'injection de cellules. Les animaux sont nourris et abreuvés *ad libitum* et exposés à un cycle diurne de 12 heures. Nous avons utilisé de même des Hamster femelles âgées de 7 jours provenant de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille (Service de Mr P. Billaut que nous tenons à remercier ici). Ces animaux sont gardés par groupes de 3 dans des cages, nourris, abreuvés et éclairés de la même manière.

Les injections de cellules sont effectuées à l'aide de seringues stériles munies d'aiguilles de taille 0,45 x 12 mm (Terumo). En ce qui concerne les souris "nude", le souci de stérilité nous a conduit à utiliser le protocole suivant :

- Les cellules à injecter sont récoltées comme il est décrit dans le paragraphe "Culture de Cellules" ci-dessous. Elles sont placées, au nombre désiré, dans des tubes stériles (Falcon, un tube par dose à injecter) et sédimentées par centrifugation (800 rpm ; 5 min). Le surnageant est décanté et du milieu DMEM dépourvu de sérum, préchauffé à 37°C, est ajouté aux culots à raison de 0,1 ml par tube.

- Des seringues stériles de 1 ml sont chargées en aspirant le contenu des tubes. Les aiguilles sont ensuite fixées sur les seringues et l'assemblage est emballé stérilement dans une feuille d'aluminium préalablement rincée à l'éthanol absolu et exposée au rayonnement UV sous la hotte à flux laminaire pendant 5 min. Les "doses" ainsi préparées sont elles-mêmes emballées dans une feuille d'aluminium pour faciliter l'introduction dans l'isolateur.

- Les injections sont ensuite effectuées le plus rapidement possible, par voie sous-cutanée, dans le dos des animaux.

Afin de poursuivre les études biochimiques sur les cellules tumorales, les animaux sont sacrifiés à l'éther et disséqués stérilement. La mise en culture des tumeurs et des tissus envahis par des cellules tumorales métastatiques est décrite dans le paragraphe suivant.

D. CULTURE DE CELLULES

Toutes les opérations sont réalisées stérilement sous la hotte à flux laminaire. Les pipettes en verre utilisées sont stériles et systématiquement flambées au bec Bunsen avant utilisation. Les milieux et solutions utilisées sont préchauffés à 37°C (bain-marie).

1. Mise en culture d'une souche congelée

L'ampoule est prélevée du container d'azote liquide et agitée vigoureusement dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la fonte complète de son contenu. Elle est ensuite rincée à l'éthanol absolu et ouverte sous la hotte. Le contenu est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur et transféré dans un tube conique Falcon de 15 ml contenant 10 ml de milieu D 10 FCS ; le tube est centrifugé (800 rpm ; 5 min) afin de sédimenter les cellules tout en diluant le DMSO contenu dans le milieu de congélation. Le surnageant est alors décanté et le culot, repris à la pipette par 10 ml de milieu, est partagé dans deux boîtes de Pétri de 100 mm (Falcon) contenant chacune 5 ml de milieu. Les boîtes sont placées en incubateur à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ (incubateur Heinike National Company 7341).

2. Mise en culture à partir de biopsies

Le fragment de tissu (tumeur primaire ou métastatique, poumon, foie, rein) est excisé sous hotte à l'aide de matériel de dissection stérile. Il est rincé dans du milieu de culture et placé dans une boîte de Pétri de 100 mm contenant 5 ml de milieu où il est dilacéré à l'aide de ciseaux fins ou d'un scalpel jusqu'à obtenir une bouillie. Le contenu de la boîte est alors aspiré à la pipette et partagé en 2 boîtes neuves contenant chacune 10 ml de milieu. Celles-ci sont aussitôt placées dans l'incubateur à CO₂.

3. Entretien d'une souche

La boîte de Pétri à diviser est placée sous la hotte. Le milieu est aspiré et le tapis cellulaire rincé par 5 ml de solution VT, aussitôt aspirée afin d'éviter le décollement. On ajoute alors 1 ml de

solution VT et on laisse reposer pendant quelques minutes. Les cellules sont ensuite mises en suspension en tapotant le bord de la boîte et reprises à la pipette dans du milieu de culture de manière à disperser d'éventuels agrégats et à inactiver la trypsine. La suspension cellulaire est répartie dans de nouvelles boîtes contenant du milieu, placées aussitôt dans l'incubateur à CO₂. A titre d'exemple, une division au tiers est effectuée en reprenant la boîte-mère par 8 ml de milieu et en répartissant les 2 ml résultants en 3 boîtes contenant chacune 7 ml de milieu ; le volume final dans chaque boîte est de 10 ml.

4. Clonage cellulaire en milieu semi-solide

Une solution d'Agar Noble (Difco) à 36 % (p:v) est préparée à l'avance par lots de 1 l (solution de NaCl 6,8 g KCl 0,4 g agar 360 g H₂O q.s.p. 1 l, chauffée à 100°C sous agitation, partagée en flacons de 60 ml, stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 15 min et conservée à 4°C).

Le clonage est effectué dans des boîtes de Pétri de 60 mm dans lesquelles on coule une sous-couche à 0,9 % d'agar préparée à partir de la solution-mère, comme suit :

- 5 ml d'une solution de Bactotryptose-phosphate (Difco) à 2,9 % (stérilisée par autoclavage à 100°C pendant 15 min) et 5 ml de sérum de veau foetal (Gibco) sont ajoutés à 50 ml de milieu D 10 FCS préchauffé à 41°C : 15 ml de la solution-mère d'agar, également préchauffée à 41°C, y sont alors ajoutés.

- La solution à 0,9 % est coulée dans des boîtes de Pétri à raison de 5 ml/boîte et les boîtes sont laissées à température ambiante jusqu'à la prise en masse de l'agar.

- 25 ml de la solution à 0,9 % sont alors prélevés et dilués au tiers en y ajoutant 40 ml de milieu D 10 FCS et 10 ml de milieu conditionné (milieu des boîtes contenant les cellules à cloner) stérilisé extemporanément par filtration sur un filtre Millex HA 0,45 µm. Cette solution à 0,3 % d'agar est alors inoculée par les cellules à cloner, récoltées par trypsination (environ 50 000 cellules, dans 5 ml, par boîte). La solution est déposée lentement au-dessus de la couche d'agar à 0,9 %. Dès la prise du réseau, les boîtes sont transférées délicatement dans l'incubateur à CO₂ et maintenues à 39°C pendant une nuit, puis à 37°C jusqu'à l'apparition des clones.

5. Radiomarquage métabolique

Nous avons procédé au marquage métabolique des glycanes de type N-acétyllactosaminique afin de suivre leur fractionnement par comptage de la radioactivité.

En règle générale, les cellules normales ou de référence sont marquées au tritium par incubation en présence de chlorhydrate de D-[6-³H]-glucosamine (solution aqueuse à 1 mCi/ml (37 MBq/ml) de radioactivité spécifique 38 Ci/mmol (1,41 TBq/mmol), Amersham). Les cellules transformées sont marquées au carbone 14 par du chlorhydrate de D-[1-¹⁴C]-glucosamine (solution aqueuse à 200 µCi/ml (7,14 MBq/ml) de radioactivité spécifique 58,7 mCi/mmol (2,18 GBq/mmol), Amersham).

On procède au marquage de 4 à 6 flacons de 175 cm² (Falcon) par lignée cellulaire, en

ajoutant, au moment du repiquage, 125 μCi de [^3H]-glucosamine ou 75 μCi de [^{14}C]-glucosamine par flacon, dans le milieu de culture.

6. Comptage des cellules

Le comptage des cellules après trypsinisation est effectué au compteur Coulter. Pour ce faire, on procède à la centrifugation du trypsinat et on reprend le culot dans 10 ml de milieu. 1 ml de cette suspension est prélevé et placé dans une Accuvette contenant 9 ml de solution Isoton II (Coultronics, France). La mesure est effectuée sur 0,5 ml de cette suspension diluée.

7. Congélation d'une souche

Le contenu de deux à trois boîtes de Pétri de 100 mm (5 à $10 \cdot 10^6$ cellules, selon les cas) est trypsinisé. Les cellules sont rassemblées dans 10 ml de milieu à la pipette et centrifugées dans un tube conique Falcon (800 rpm ; 5 min). Le culot est resuspendu dans 2 ml du milieu de congélation et introduit dans une ampoule de verre. Le col de l'ampoule est scellé au microchalumeau et celle-ci est aussitôt placée dans la vapeur d'azote liquide. Le refroidissement ainsi obtenu est de $-1^\circ\text{C}/\text{min}$. Au minimum 4 heures plus tard, l'ampoule peut être plongée dans l'azote liquide.

8. Microscopie et photographie des cultures

Les cultures cellulaires sont quotidiennement observées au microscope inversé afin de déceler d'éventuelles anomalies de la croissance ou des contaminations par des microorganismes. Toute boîte de culture contenant des cellules à aspect maladif est systématiquement éliminée.

Les cultures sont photographiées à des grossissements objectif de 30x à 100x (Microscope Zeiss IM 35 ; boîtier à exposition automatique Contax ; pellicule Kodak T-Max 400 ASA ; révélateur et fixateur Kodak ; papier et réactifs de tirage Ilford Multigrade 3).

Les photographies d'animaux porteurs de tumeurs sont effectuées à l'aide d'un appareil Pentax ME automatique sur pellicule Kodak Ektachrome 160 ASA Professional.

Les analyses histologiques et photographies des préparations de tumeurs colorées à l'hématoxyline-éosine ont été effectuées au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital pour Enfants Agia Sophia (Athènes, Grèce, Professeur E. Kazlaris, que nous tenons à remercier ici).

E. TRANSFECTIONS ET SELECTION DE CLONES

Les plasmides pSV2neo EJ (Southern & Berg, 1982) et c-Ha-ras EJ (Tabin et al., 1982), nous ont été fournis par le Dr S.Saule que nous tenons à remercier vivement. La transfection de ces DNA dans les cellules BHK 21/C13 et NIH 3T3 est effectuée par la technique du coprécipité DNA-phosphate de calcium selon (Graham et Van der Eb, 1973), modifiée comme suit :

Le jour précédant la transfection, $5 \cdot 10^5$ cellules sont semées dans des boîtes de Pétri de 60

mm à raison de 5 à 10 boîtes par type de cellules. Le lendemain, le milieu est aspiré et remplacé par 5 ml de milieu MEM de Eagle, 20 mM en HEPES (Flow Laboratories). Les boîtes sont placées en incubateur sans CO₂ pendant 2 h, à 37°C. On ajoute alors le mélange de transfection suivant, à raison de 240 µl par boîte :

CaCl₂ 2 M, 30 µl ; DNA entraîneur 20 µg dans 50 µl ; DNA plasmidique à transférer 5 µg dans 5 µl ; 240 µl de tampon HeBS 2x (NaCl (Merck) 16 g/l, KCl (Merck) 0,74 g/l, Na₂HPO₄ · 12 H₂O (Merck) 0,5 g/l, HEPES (Sigma) 10 g/l, D-Glucose 2 g/l, pH 7,1) ; 155 µl d'eau Milli-Q (Millipore).

Après 4 h à 37°C sans CO₂, le milieu est aspiré et remplacé par 5 ml D 10 FCS. Les boîtes sont alors placées dans l'incubateur à CO₂, pendant une nuit.

Le jour suivant, les cellules de chaque boîte sont récoltées par trypsinisation et passées dans une boîte de Pétri de 100 mm. Deux à trois jours plus tard, alors que les cultures ont atteint une confluence relative de 20 %, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 0,5 à 1 mg/ml de sulfate de généticine G418 (Gibco) ; ce milieu de sélection est renouvelé tous les 3 jours.

Des colonies résistantes à l'antibiotique apparaissent au bout de 15 à 20 jours. Elles sont alors trypsinisées, rassemblées et entretenues par passage tous les 2 ou 3 jours.

Nous avons procédé de même à la sélection de cellules résistantes après mise en culture des organes susceptibles d'avoir été colonisés par des cellules métastatiques contenant les gènes introduits.

F. ANALYSES GENOMIQUES

1. Isolement des DNA

a. DNA cellulaire

Les cellules contenues dans une dizaine de boîtes de Pétri sont rincées rapidement avec de l'eau physiologique, trypsinisées à l'aide de la solution VT, sédimentées par centrifugation et reprises dans un tube de 9 ml de tampon STE (Tris 10 mM-HCl pH 7,1 NaCl 100 mM EDTA 1 mM) auquel on ajoute 1 ml d'une solution de SDS à 10 % (concentration finale 50 µg/ml).

Après 1 h à 37°C, on ajoute 1 volume de réactif au phénol (Maniatis *et al.*, 1982). Le contenu du tube est agité en retournant celui-ci pendant 1 à 2 min, puis centrifugé (1000 rpm ; 2 min) afin de séparer deux phases. La phase aqueuse supérieure est prélevée à la pipette ; le DNA est précipité, après addition de 0,1 volume d'AcONa 2 M pH 6,5 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu refroidi à -20°C. Le précipité est isolé par centrifugation (10 000 rpm ; 10 min) dans un tube Corex ou par enroulement autour d'une pipette ("spooling"). Il est repris par de l'eau en q.s.p. une concentration finale de 100 µg/ml estimée par rapport à une quantité connue après électrophorèse en gel d'agarose.

b. DNA tumoral

Un fragment de tumeur est placé dans l'azote liquide et le bloc congelé est réduit en poudre dans un mortier. La poudre obtenue est reprise dans 10 ml de la solution de lyse déjà décrite (STE-SDS-protéinase K) et broyée dans un homogénéiseur Potter B. L'extraction du DNA à partir de ce lysat est effectuée comme décrit ci-dessus.

2. Digestion des DNA par des endonucléases de restriction

Dans tous les cas, les tampons de digestion, les temps et les températures d'incubation sont ceux préconisés par le fabricant. En règle générale, l'incubation est réalisée à 37°C pendant 2 h. Nous avons utilisé les enzymes suivants : Asp 718 (Boehringer), Bgl II, Bam HI, Kpn I (Gibco BRL), Hind III (Appligene).

3. Electrophorèses en gel d'agarose

a. Electrophorèse-test

Un gel d'agarose (Bio-Rad) à 1 % (p:v) est préparé dans du tampon borate (dilué extemporanément à partir d'une solution-mère concentrée 10 fois : HBO₃ 137 g Tris 270 g EDTA 24 g H₂O q.s.p. 5 l, ajustée à pH 8,3 par addition d'HCl) contenant 1/20 000^e de volume de solution à 10 mg/ml de bromure d'éthidium. Le gel est coulé dans une mini-cuve et l'électrophorèse est réalisée dans le même tampon sous 100 V, pendant 30 min.

La migration des fragments de restriction est visualisée sous rayonnement UV (360 nm) par la fluorescence du bromure d'éthidium.

b. Electrophorèse analytique

Le gel d'agarose à 1 % est préparé dans du tampon phosphate de sodium 10 mM de pH 6,8 préparé extemporanément par dilution d'une solution-mère concentrée 100 fois. Le bromure d'éthidium est ajouté comme précédemment afin de visualiser les bandes sous rayonnement UV. L'électrophorèse est effectuée sous 20 à 25 V, pendant 16 à 20 h.

c. Electrophorèse préparative

Le gel d'agarose à 1 % est préparé dans du tampon TEA dilué à partir d'une solution concentrée 200 fois (Tris 2 M-HCl de pH 8,15 NaCl 1 M AcONa 1 M EDTA 50 mM) et coulé dans une grande cuve. L'électrophorèse est réalisée dans ce tampon à la tension de 2 à 3 V/cm, pendant 16 à 20 h.

La séparation des bandes est suivie sous rayonnement UV (360 nm). Lorsqu'elle est suffisante, les DNA sont récupérés de la manière suivante :

Une fenêtre est creusée dans l'agarose, sous la bande à isoler. Un gel d'agarose à 0,25 % dans le tampon TEA y est coulé et l'électrophorèse est poursuivie dans les mêmes conditions que précédemment. Lorsque toute la bande a pénétré dans le gel lâche, celui-ci est découpé et placé dans un tube "cappé" (Falcon). Le tube est plongé pendant 30 sec dans l'azote liquide puis placé à 37°C au bain-marie pendant 20 min ; il est alors agité vigoureusement à l'aide d'un Vortex. Ce cycle de congélation-décongélation est répété 2 à 3 fois, ce qui a pour effet de casser le réseau du gel et de libérer le DNA. Le contenu du tube est alors filtré sur filtre Millex HA 0,45 µm (Millipore). Filtre et fragments d'agarose sont rincés avec 0,5 ml de tampon STE, et les filtrats sont rassemblés.

Le DNA ainsi préparé est récupéré par précipitation à l'éthanol absolu comme précédemment.

4. Préparation des sondes de DNA et radiomarquage par translation de coupure

Le DNA est digéré par les enzymes de restriction et le fragment choisi est isolé par électrophorèse préparative en gel d'agarose, extrait du gel et purifié, puis radiomarké au ³²P comme suit :

Le milieu réactionnel est celui du "Nick translation kit" N°500 (Amersham). Les conditions opératoires sont celles que préconise le fabricant. Le précurseur radioactif est du α-[³²P]-dCTP (New England Nuclear, activité spécifique 580 Ci/mmol). Généralement, on utilise 100 µCi de précurseur et on opère à 14°C, pendant 1 à 2 h.

La réaction est stoppée par addition de 500 µl de tampon STE, puis le DNA est séparé des nucléotides libres sur une colonne de DEAE-cellulose (Elutip-d, Schleicher et Schüll) comme suit :

L'échantillon est percolé lentement au travers de la colonne à l'aide d'une seringue. La colonne est rincée par 2 ml de tampon STE. L'éluat est alors réalisé par 500 µl de tampon Tris 10 mM-HCl de pH 7,1 EDTA 10 mM NaCl 1M, puis par 50 µl de solution NaOH 6 N. Après 20 min, on ajoute à l'éluat 40 µl d'HCl 6 N (neutralisation), puis 20 µl de la solution de DNA entraîneur du "kit" réactionnel. Le volume est ajusté à 3 ml avec de l'eau.

La radio-activité de la sonde est alors mesurée en plaçant 10 µl dans un tube auquels on ajoute 150 µl d'eau, 50 µl de DNA entraîneur et 1 ml du tampon PCA (Na₄P₂O₇·10 H₂O 180 g acide perchlorique concentré 200 ml H₂O q.s.p. 1 l). Après 5 min à 20°C, l'échantillon est filtré (filtre de fibre de verre préalablement mouillé avec de l'acide chlorhydrique à 0,1 % et rincé à l'éthanol) ; le filtre est rincé à l'éthanol et séché, puis introduit dans une fiole de comptage à laquelle est ajouté le liquide de scintillation (Ready - Safe, Beckman).

5. Transfert sur nitrocellulose

Les DNA analysés par électrophorèse en gel d'agarose après digestion par des endonucléases de restriction, sont transférés sur une feuille de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham) par la technique de Southern ("Southern blotting") (Maniatis *et al.*, 1982) :

Le gel est placé dans le tampon de dénaturation (NaOH 0,5N NaCl 1,5 M) pendant 45 min, ce qui déshybride les deux brins de la molécule de DNA. Il est ensuite neutralisé par deux bains de 40 min dans le tampon de neutralisation (Tris 0,5 M-HCl de pH 7 NaCl 3 M) afin d'éviter la

dégradation de la nitrocellulose en milieu alcalin.

Le transfert s'effectue dans le tampon SSC 6x dilué à partir d'une solution-mère SSC 20x (citrate trisodique 0,3 M NaCl 3 M), comme suit :

- Deux bandes de papier Whatman 3MM, coupées à la largeur du gel, sont saturées en tampon et déposées sur une plaque de plexiglass de façon à ce que les deux extrémités des bandes trempent dans le tampon.

- Le gel est alors déposé à plat sur ces bandes, arrosé de tampon et recouvert d'une feuille de nitrocellulose, elle-même recouverte d'une feuille de papier Whatman 1M saturée en tampon. L'ensemble est surmonté d'un empilement de feuilles de papier-filtre, d'une plaque de plexiglass et d'un léger poids. Le papier-filtre absorbe le tampon à travers le gel, faisant ainsi "remonter" les fragments de DNA vers la feuille de nitrocellulose.

- Après 10 à 20 h de transfert, la feuille de nitrocellulose est récupérée et chauffée à 80° C pendant 2 h. Le "blot" ainsi obtenu peut être hybridé.

6. Hybridation moléculaire

Une étape de préhybridation avec du tampon seul est nécessaire afin de saturer les sites de fixation aspécifique de la sonde sur la feuille de nitrocellulose. Le tampon utilisé pour la préhybridation et l'hybridation est préparé extemporanément (10 ml) comme suit : formamide 5 ml HEPES 1 M de pH 7 0,5 ml SSC 20x 1,5 ml solution Denhardt (sérum albumine bovine, 4 % Ficoll 400, 4 % polyvinylpyrrolidone, 4 % H₂O ; 0,25 volumes de chaque) 1 ml DNA entraîneur en solution à 5 mg/ml 50 µl H₂O en q.s.p. 10 ml.

La feuille de nitrocellulose est placée dans un sachet de cellophane. Le tampon de préhybridation est ajouté, puis le sachet est soudé et placé à 42°C pendant 30 min. La sonde est alors ajoutée à raison de 10⁷ cpm par "blot", le sachet est soudé à nouveau et placé à 42°C pendant 24 à 48 h.

7. Autoradiographie

Le tampon contenant la sonde est récupéré en vue d'une ré-utilisation éventuelle et conservé à -20°C. Les "blots" sont ensuite lavés deux fois (50°C, 30 min) avec du tampon SSC 2x-SDS 0,1 % (premier lavage) et SSC 0,1x-SDS 0,1 % (second lavage), séchés entre deux feuilles de papier-filtre, enveloppés dans une feuille de cellophane et placés dans une cassette Kodak munie d'écrans intensificateurs, au contact d'un film Kodak X-0 Mat S.

L'autoradiographie est réalisée à -70°C pendant 24 h à 1 semaine, puis les autoradiogrammes sont révélés et fixés (réactifs Kodak).

Les "blots" peuvent être hybridés avec une autre sonde après déshybridation (NaOH 0,1 N ; 41°C ; 15 min) et lavage (SSC 0,1x ; 41°C ; 50 min) suivie d'une nouvelle préhybridation.

G. PRODUCTION DE CELLULES EN MASSE

Nous avons employé différents procédés de culture : culture dans des flacons de 175 cm² (Falcon), dans des bouteilles de 850 cm² "rollers" (Corning), sur des Unités double-tray de 1200 cm² (Nunc) et sur des microporteurs Cytodex 1 (Pharmacia). Les procédures d'ensemencement et de récolte des cellules étant différentes, nous allons détailler les particularités de chaque système.

1. Culture sur flacons et unités double-tray

Pour la production sur plastique, en flacon de 175 cm² ou unité double-tray, on inocule généralement une boîte de Pétri de 100 mm dans un flacon et 2 à 4 flacons dans une unité. Dans ces cas, les cellules sont récupérées par grattage dans le tampon PBS. De manière à accéder au tapis cellulaire d'un double-tray, on sépare les deux plateaux en cassant la soudure qui les unit. Une variante de cette méthode consiste à remplacer le milieu par 10 ml de PBS contenant de l'EDTA 0,2 à 2 % (p:v) selon le type cellulaire. La monocouche se détache alors en lambeaux facilement pipetables. Les cellules sont récupérées par centrifugation (1000 rpm ; 5 min) et congelées à -20°C.

2. Culture sur bouteilles "rollers"

Chaque bouteille "roller" est inoculée, dans 60 ml de milieu, par 1 flacon de 175 cm² (cellules récoltées par trypsinisation). L'atmosphère est "gazée" en CO₂ afin d'acidifier légèrement le milieu, ce qui favorise l'adhésion des cellules au support et permet un meilleur démarrage de la croissance. Les bouteilles sont ensuite fermées hermétiquement et placées en chambre chaude (37°C) sur un rouleur, à la vitesse de 6 rotations par heure. Il n'est généralement pas nécessaire d'intervenir en cours de culture car ce n'est qu'occasionnellement qu'un faible volume de solution stérile de bicarbonate de sodium à 5,5 % p:v (2 à 5 ml) doit être ajouté, en fin de culture, afin d'éviter une acidification excessive du milieu.

Il est possible de récolter les cellules et d'utiliser les bouteilles une seconde fois, par le protocole suivant, en prenant le maximum de précautions pour préserver la stérilité :

- Le milieu est retiré et la bouteille rincée par 30 ml de PBS à température ambiante.
- On ajoute 20 ml d'EDTA 2 % (p:v) dans PBS (solution préchauffée à 37°C) et les bouteilles sont placées sur le rouleur pendant 10 à 20 minutes, ce qui a pour effet de décoller la monocouche en lambeaux.

- Les cellules sont aspirées et placées dans un tube conique Falcon de 50 ml. La bouteille est rincée par 5 à 10 ml de PBS (rinçage ajouté au tube Falcon) et les cellules sont récoltées par centrifugation (800 rpm ; 5 min) et conservées à -20°C dans 10 volumes de méthanol redistillé.

- La bouteille est placée à nouveau pendant 20 à 30 min sur le rouleur après addition de 10 ml de solution VT, ce qui permet de dissocier les agrégats résiduels et de fournir suffisamment de cellules viables pour obtenir une nouvelle culture. Enfin, 200 ml de milieu D 10 FCS sont ajoutés, et la bouteille " gazée" en CO₂ est fermée et replacée sur le rouleur à 37°C.

Une troisième utilisation des bouteilles par la même procédure serait envisageable, au risque de contaminations, d'une part, et d'altérations des propriétés d'adhésion du support, d'autre part. Nous avons donc éliminé les bouteilles employées après deux cycles de culture.

3. Culture sur microporteurs Cytodex 1

Les microporteurs sont préparés à la culture en faisant gonfler la poudre fournie dans du tampon PBS stérile (au minimum 4 h à 37°C ou une nuit à température ambiante) à raison de 5 g de Cytodex pour 500 ml PBS, dans des flacons en verre préalablement siliconés (solution de silicone Merck ; fixation à 120°C pendant 2 h ; rinçage à l'eau Milli-Q). Le surnageant est rapidement décanté et remplacé par 100 ml de PBS stérile frais. Les flacons sont ensuite stérilisés par autoclavage (120°C ; 20 min). Les microporteurs sont rincés par 200 ml de milieu sans sérum qui est aspiré dès leur décantation (2 à 5 min). Ils sont ensuite pré-incubés à 37°C dans 200 ml de milieu D 10 FCS.

La procédure d'inoculation varie selon le type de cellules à produire. Une quantité approximative de 10^6 cellules par gramme de Cytodex sec est préconisée par le fabricant (Pharmacia, 1986). Des quantités de cet ordre sont inoculées, après comptage au compteur Coulter, dans les flacons contenant les microporteurs.

Afin d'accroître l'efficacité de colonisation, la culture est remise en suspension par agitation manuelle douce pendant 1 min toutes les 15 à 30 min. Une fraction aliquote est prélevée et contrôlée au microscope de manière à évaluer la bonne adhésion des cellules et le degré de colonisation des microporteurs.

Dès lors que la quasi-totalité des cellules inoculées ont adhéré au support (une à trois heures), la culture est transférée dans un flacon "spinner", le volume est ajusté à 500 ml par addition de milieu D 10 FCS, l'atmosphère "gazée" en CO₂ et le flacon placé en chambre chaude (37°C) sur un agitateur magnétique (60 à 100 rpm). Le lendemain, le volume est porté à 1l. La moitié du milieu est renouvelée aux 3^e et 4^e jours de culture. Il est généralement nécessaire de faire remonter le pH de la culture à partir du 4^e jour, par addition de bicarbonate de sodium (5 à 10 ml de solution stérile à 5,5 % p:v, ajoutée dans le milieu de renouvellement).

Les cellules sont récoltées au 6^e et 7^e jour, par l'un ou l'autre des procédés suivants :

* Récolte par l'EDTA

Après décantation des microporteurs portant un tapis cellulaire quasi-confluent, le milieu est aspiré et remplacé par 200 ml d'EDTA à 5 % p:v dans du tampon PBS, préchauffé à 37°C. Le flacon de culture est alors placé à 37°C sous agitation pendant quelques minutes. Le contenu est ensuite filtré sous vide partiel sur un filtre Blutex nylon-mesh, retenant les microporteurs. Le filtrat, contenant les cellules détachées est aussitôt centrifugé (800 rpm ; 5 min ; 4°C) et les cellules sont rincées avec 10 volumes de PBS afin d'éliminer l'EDTA.

Une seconde incubation des microporteurs avec 200 ml d'EDTA-PBS permet de récupérer la quasi-totalité des cellules. Le second retentat est rincé sur le filtre 2 à 3 fois avec 100 ml de PBS froid (4°C). Les filtrats sont combinés et centrifugés à 4°C. Les cellules sont enfin lavées une fois

avec 10 volumes de PBS. Les culots obtenus après centrifugation sont conservés à -20°C , dans 10 volumes de méthanol redistillé.

* Récolte par sonnage

Les microporteurs sont rapidement rincés par 200 ml de PBS froid (4°C) et remis en suspension dans ce même tampon dans un volume final de 300 à 400 ml, dans un bain de glace. Les cellules sont éclatées et décollées par sonnage poussé pendant 3 min à l'aide d'une sonde exponentielle (Sonifier Cell Disruptor B-30) à une amplitude de $50\ \mu\text{m}$, en agitant continuellement le flacon dans la glace afin de limiter l'échauffement.

On procède ensuite à la filtration sur membrane Blutex nylon-mesh et à un rapide rinçage du retentat par du tampon PBS froid (4°C).

Les filtrats combinés contenant des lambeaux membranaires et des vésicules formées en cours de sonnage, sont aussitôt centrifugés à 4°C dans des godets en polycarbonate (centrifugeuse Beckman J2-2 ; rotor JA-20, 20 000 rpm correspondant à $48\ 500\ \times\ g$) pendant 3 h, ce qui permet de sédimenter la quasi-totalité du matériel membranaire. Les culots sont conservés à -20°C dans 10 volumes de méthanol redistillé.

H. PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES MEMBRANAIRES

Les glycopeptides membranaires sont préparés après délipidation des culots cellulaires, par digestion à la pronase des glycoprotéines précipitées ou par β -élimination ménagée des glycannes liés O-glycosidiquement.

Les procédures employées varient en fonction de la quantité de cellules à délipider. Nous allons successivement décrire les diverses méthodes utilisées. Dans ce qui suit, C = chloroforme, M = méthanol redistillé, W = eau Milli-Q.

1. Délipidation de petites quantités de cellules

Le protocole utilisé est celui d'Oliver et Hemming (Oliver & Hemming, 1975) modifié comme suit par R.Cacan :

Le contenu de 4 à 6 flacons de $175\ \text{cm}^2$ est récupéré par grattage dans du tampon PBS. Les cellules sont sédimentées par centrifugation et lavées 3 fois par 10 ml de PBS (800 à 1000 rpm ; 2 min). Le culot est repris par 1 ml de PBS dans un tube en verre et mis en contact avec 1 ml du mélange C : M, 2 : 1 (v:v).

Après agitation au Vortex, le tube est centrifugé (1000 rpm ; 2 min) afin de séparer la phase inférieure chloroformique de la phase aqueuse supérieure et d'une interface contenant les glycoprotéines précipitées.

La phase inférieure est prélevée à la pipette Pasteur et le reste est lavé 3 fois par 1 ml de phase inférieure théorique C : M : MgCl_2 4 mM (86 : 14 : 1 ; v : v : v). Les phases inférieures sont combinées. La phase supérieure est aspirée et le culot lavé 3 fois par 2 ml de la phase supérieure

théorique C : M : MgCl_2 4 mM (3 : 48 : 47 ; v : v : v) en combinant les phases supérieures de lavage à la phase supérieure initiale.

Le culot résultant est extrait 3 fois par 2 ml de C : M : W (10 : 10 : 3 ; v : v : v). Les extraits sont combinés et le culot lavé une fois par 2 ml d'eau avant de procéder à l'hydrolyse pronasique.

2. Délipidation de quantités préparatives

Pour des raisons de commodité, nous avons choisi un protocole légèrement différent, permettant de travailler sans démixion des phases, modifié d'après Esselman *et al.*, 1972 :

Les culots de cellules provenant de la culture sur microporteurs ou bouteilles "rollers" ou unités double-tray sont rassemblés dans 10 volumes de méthanol redistillé et centrifugés (1 000 rpm ; 5 min). Le surnageant est récupéré et le culot extrait deux fois par 10 volumes de C : M (2 : 1 ; v : v), puis par 10 volumes de C : M (1 : 2 ; v : v) (extrait "CM"). Tous ces surnageants sont rassemblés. Le culot est ensuite extrait par 20 volumes, puis par 10 volumes de C : M : W 10 : 10 : 3, v : v : v et lavé une fois à l'eau. Les extraits "CMW" sont également rassemblés.

Les culots de protéines et glycoprotéines ainsi préparés sont soumis à la digestion pronasique ou à la β -élimination.

3. Hydrolyse pronasique

Le culot délipidé est repris dans un tube de verre par 6 ml d'eau (ou dans un flacon, par 60 ml d'eau, dans le cas de quantités préparatives). On y ajoute 1 ml (ou 10 ml) du tampon concentré suivant : Tris 1 M-HCl de pH 8,4 CaCl_2 0,1 M (Merck) 5 mg (ou 50 mg) de Pronase (Calbiochem ; EC 3.4.21.4).

Les échantillons sont alors placés au bain-marie à 37°C sous agitation magnétique après addition de quelques gouttes de toluène afin d'éviter la croissance bactérienne. La même quantité d'enzyme est ajoutée au bout de 24 et 48 h. La réaction est stoppée à la 72^e heure en refroidissant le milieu réactionnel. Les hydrolysats sont alors centrifugés afin d'éliminer d'éventuels composés insolubles, concentrés sous vide partiel à l'évaporateur rotatif (Rotavapor Büchi) et dessalés sur une colonne (4,5 x 35 cm) de Trisacryl GF-05 M (IBF), équilibrée dans de l'eau, sous un débit de 100 ml/h. Ils sont ensuite concentrés à nouveau et redessalés sur une colonne (1,6 x 80 cm) de Bio-Gel P2 (Bio-Rad) équilibrée dans de l'eau, sous un débit de 20 ml/h, ou une colonne (1,6 x 40 cm) de Fractogel TSK HW-40S (Merck) équilibrée dans de l'acide acétique à 0,5 % dans l'eau, sous un débit de 60 ml/h.

4. β -Élimination préparative

Le culot de glycoprotéines est repris dans 100 ml de NaOH 0,05 N NaBH_4 1 M et placé au bain marie à 45°C pendant 16 h, à reflux et sous agitation magnétique (pour le mode opératoire de référence, cf. Montreuil *et al.*, 1986). La réaction est alors stoppée par addition d'acide acétique à 50 % (v:v) jusqu'à pH 4,5. Le milieu réactionnel est aussitôt neutralisé par addition de NaOH

diluée à 10 % (v:v).

L'hydrolysate est alors séché sous vide partiel à l'évaporateur rotatif et les borates entraînés par 4 lavages successifs au méthanol redistillé, suivis d'une évaporation à siccité. Le résidu est repris par le minimum d'eau (15 à 20 ml) et déposé sur une colonne (4,5 x 100 cm) de Trisacryl GF-05 M équilibrée dans de l'eau, avec un débit de 100 ml/h. Cette opération permet de dessaler les N-glycosyl-peptides qui passent au volume mort de la colonne, tout en isolant, en fin de fractionnement, les glycanes libérés par β -élimination. Ces derniers sont repris, concentrés par évaporation, lyophilisés et conservés à -20°C en vue d'analyses ultérieures.

I. FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES

1. Chromatographie de tamisage moléculaire et chromatographie d'affinité

Les glycopeptides totaux obtenus après digestion pronasique sont fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur une colonne (1,8 x 140 cm) d'Ultrogel AcA 202 (IBF) équilibrée dans le tampon AcA. Cette opération permet une séparation relative entre les N-glycosylpeptides et les O-glycosylpeptides, ces derniers étant élués au volume mort de la colonne. Chaque population est concentrée par évaporation et dessalée sur une colonne de Trisacryl GF-05 M ou de Bio-Gel P2 équilibrée dans de l'eau. Les O-glycosylpeptides sont conservés à -20°C en vue d'analyses ultérieures.

Les N-glycosylpeptides provenant de cette étape de tamisage moléculaire ou du dessalage après β -élimination, sont ensuite fractionnés par chromatographie d'affinité sur des colonnes de ConA-Sepharose (Pharmacia) et de LCA-Sepharose (LCA préparée et couplée au support par H. Debray) (voir Merkle & Cummings, 1987 ; Osawa & Tsuji, 1987).

La colonne (2,5 x 18 cm) de ConA-Sepharose est équilibrée dans du tampon-ConA. L'échantillon est déposé dans le plus petit volume possible (habituellement 5 à 10 ml) équilibré dans ce tampon par l'addition d'un dixième en volume de tampon concentré. L'éluion est opérée en collectant, avec un débit de 60 ml/h :

- une fraction non-retenue (FNRC)
- une fraction faiblement retenue, éluee par de l' α -MeGlc 0,01 M (FEC 0,01 M)
- une fraction fortement retenue, éluee par de l' α -MeGlc 0,3 ou 0,5 M (FEC 0,5 M)

Chacune de ces fractions est ensuite concentrée par évaporation et dessalée à l'aide de l'un ou de l'autre des gels déjà décrits. Généralement, un premier dessalage grossier est effectué sur Trisacryl GF-05 M, et il est suivi d'un second dessalage sur Bio-Gel P2.

Les fractions FNRC sont systématiquement recyclées sur la colonne afin d'assurer leur épuisement en structures reconnues par la lectine. Les fractions FNRC et FEC 0,01 M sont ensuite sous-fractionnées sur une colonne (1,6 x 6 cm) de LCA-Sepharose, équilibrée dans du tampon PBS. L'échantillon est équilibré dans ce tampon par addition d'un dixième en volume de tampon concentré. L'éluion est opérée sous un débit de 9 ml/h en collectant :

- une fraction non-retenue (FNRL)
- une fraction éluée par l' α -MeGlc 0,15 M (FEL).

Ces fractions sont concentrées, dessalées et lyophilisées.

2. Hydrazinolyse

Les fractions les plus "lourdes" (FNRC-FNRL) sont soumises à l'hydrazinolyse selon Kobata (méthode décrite dans Montreuil *et al.*, 1986) comme suit :

Dès la sortie du lyophilisateur, 1 ml d'hydrazine anhydre est ajouté à la poudre de glycopeptides, dans un tube Sovirel à bouchon étanche. Le tube est porté à 100°C pendant 8 h. L'hydrazine est évaporée sous courant d'azote (en ajoutant quelques gouttes de toluène, qui sert d'entraîneur). Le contenu du tube est alors repris par 1 ml de NaHCO₃ saturé et N-réacétylé par 5 additions, répétées toutes les 10 minutes, de 20 μ l d'anhydride acétique, dans un bain de glace. Après dessalage (colonne de Bio-Gel P2 équilibrée dans de l'eau), la solution de glycannes est concentrée par évaporation et reprise dans 1 ml d'eau. Une goutte de NaOH concentrée est ajoutée ainsi que 10 mg de NaBH₄ afin de réduire les oligosaccharides. Après 4 h de réduction à température ambiante, l'excès de borohydrure est détruit par l'addition goutte à goutte d'acide acétique à 50 %, sur la glace, jusqu'à l'arrêt de l'effervescence. La solution d'oligosaccharides est à nouveau dessalée sur Bio-Gel P2, évaporée à siccité et le résidu obtenu est repris dans un minimum d'eau.

3. Fractionnement par HPLC d'échange d'anions

Les oligosaccharides libérés par hydrazinolyse sont fractionnés selon une technique mise au point au laboratoire (Paz Parente *et al.*, 1984 ; Cardon *et al.*, 1986) sur une colonne Micro Pak AX-10 (10 μ m ; 4 x 300 mm ; Varian) par un gradient eau distillée (A) - KH₂PO₄ 0,5 M de pH 4,2 (B) (pompe Spectra Physics 8700 ; détecteur de l'absorbance UV à 206 nm Kratos Spectroflow 757 ; enregistreur-intégrateur Spectra Physics 4100), comme suit :

- élution isocratique (100 % A) pendant 15 min
- gradient linéaire jusqu'à 2,5 % B en 10 min
- élution isocratique à 2,5 % B pendant 20 min
- gradient linéaire jusqu'à 5 % B en 10 min
- élution isocratique à 5 % B pendant 20 min
- gradient linéaire jusqu'à 20 % B en 10 min
- élution isocratique à 20 % B pendant 10 min
- élution isocratique à 35 % B pendant 20 min.

La colonne est régénérée en pratiquant un palier isocratique à 50 % de B pendant 30 min, suivi d'un rinçage prolongé à l'eau distillée.

Les oligosaccharides sont ainsi fractionnés en fonction du nombre de résidus d'acide sialique, en populations neutres, mono-, di-, tri- et tétrasialylées (cf. Chapitre III).

J. ANALYSES STRUCTURALES DES OLIGOSACCHARIDES

1. Chromatographie en phase gazeuse

La composition centésimale et molaire des glycanes en monosaccharides, est déterminée par analyse en CPG, après méthanolyse et trifluorosilylation (méthode de Zanetta, voir Montreuil *et al.*, 1986), comme suit :

- 1 à 5 µg de glycopeptide ou d'oligosaccharide à analyser est lyophilisé dans un tube Sovirel à bouchon étanche, en présence de 0,1 à 0,2 µg de méso-inositol, servant de témoin interne

- Dès la sortie du lyophilisateur, on ajoute 200 µl du réactif anhydre : méthanol - 0,5 M en HCl. Le tube est alors fermé et la méthanolyse est effectuée durant 24 h à 80°C.

- La réaction est arrêtée en refroidissant le tube et le réactif en excès est amené à pH 6 par addition d'une pincée de carbonate d'argent.

- Les monosaccharides sont ensuite N-réacétylés par addition de 20 µl d'anhydride acétique (Merck), le tube étant placé à l'obscurité pendant une nuit, à température ambiante.

- Après centrifugation (3 000 rpm ; 5 min), le surnageant est repris et extrait 2 fois par 500 µl d'heptane distillé. La phase inférieure, méthanolique, est séchée sous courant d'azote à 50°C.

- La trifluorosilylation des monosaccharides est alors réalisée en ajoutant 50 µl de pyridine (Merck) et 50 µl de bis-silyl-trifluoroacétamide (Pierce).

- Après 2 h à l'obscurité et à température ambiante, 1 à 2 µl sont injectés dans le chromatographe (Girdel 300 ; colonne capillaire Cp Sil 5CB ; 0,25 mm x 25 m ; gaz vecteur : hélium ; pression : 0,5 bar ; détecteur à ionisation de flamme). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de température allant de 120 à 240°C (+2°C/min), suivi d'un palier de 20 min à 240°C.

2. Spectroscopie de RMN du proton à 400 MHz

Les spectres de RMN ont été réalisés par le Dr Jean-Michel Wieruszkeski que nous remercions vivement.

Les échantillons à analyser sont lyophilisés. Les protons mobiles sont échangés par 3 reprises dans de l'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$ 99,96 %, Aldrich), avec lyophilisation intermédiaire. Les analyses sont effectuées sur un spectromètre Bruker AM-400 WB opérant en mode pulsé à transformée de Fourier (température de la sonde = 27° C).

Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au signal du groupement méthyle de l'acétone utilisé comme référence interne ($\delta = 2,225$ ppm dans $^2\text{H}_2\text{O}$ par rapport au 4,4-diméthyl-4-silapentanesulfonate de sodium). Pour l'interprétation, voir Vliegthart *et al.*, 1984.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

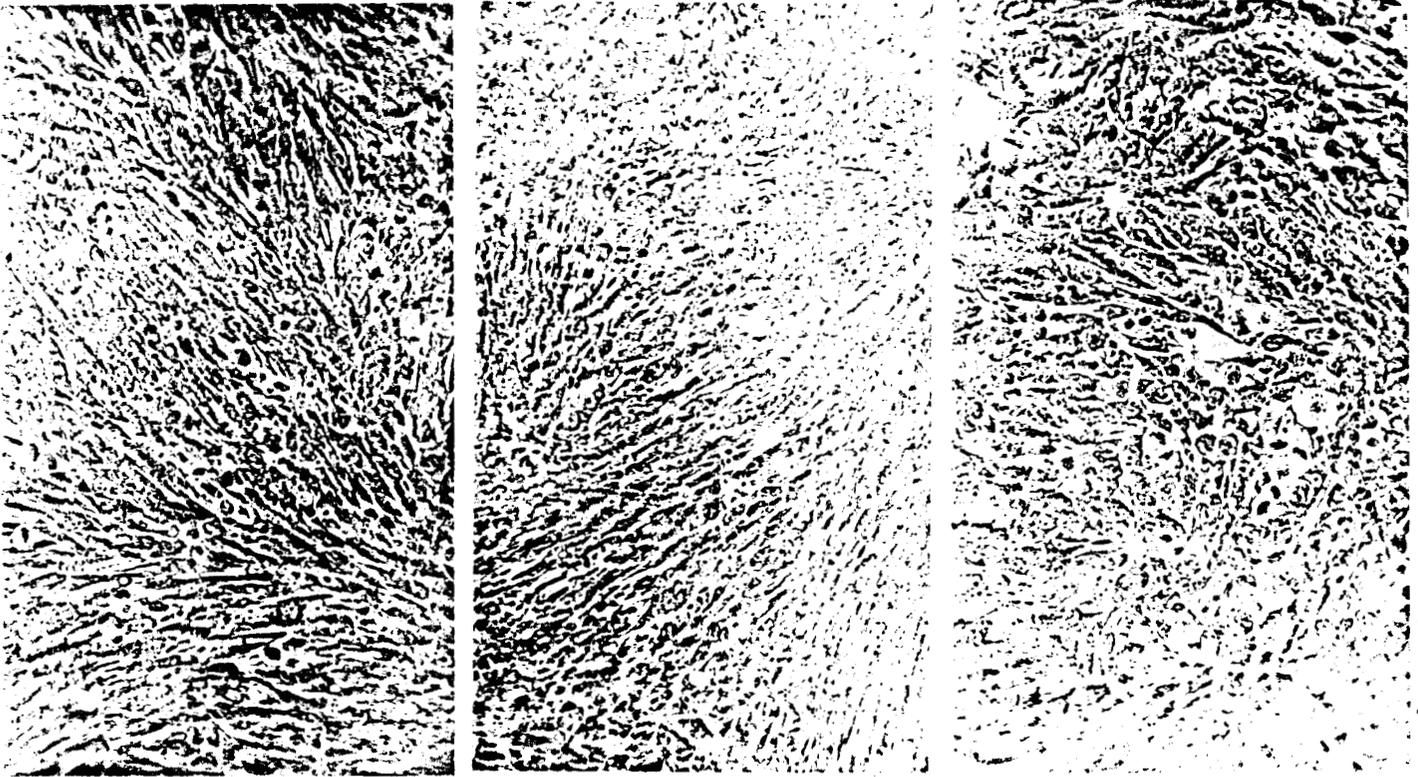


Figure 20 : Cellules du modèle BHK en culture (BHK 21/C13, BHK*neo* et BHK*ras*) x 120. Noter le changement de morphologie chez les cellules BHK*ras*.

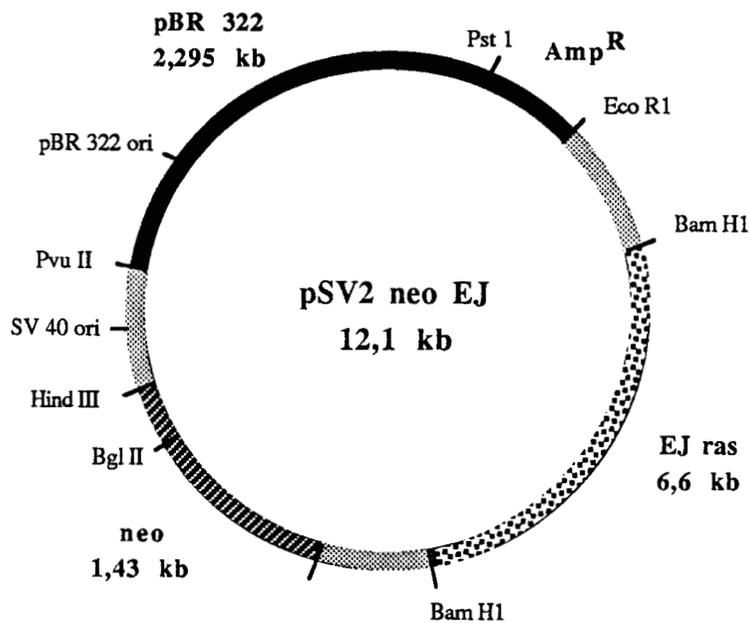


Figure 21 : Carte génétique du plasmide pSV2 neo EJ (Tabin *et al.*, 1982).

Article premier : La cellule a toujours raison

Article 2 : Si la cellule a "tort", voir article premier... (André Verbert)

Dans ce chapitre, dans le but d'alléger le texte, les cellules seront nommées comme suit :

- Cellules BHK 21/C13 : **BHK**
- Cellules BHK transformées par le virus HSV : **BHK/HSV**
- Cellules BHK transfectées avec le plasmide pSV2 *neo* : **BHK_{neo}**
- Cellules BHK transfectées avec le plasmide pSV2 *c-Ha-ras* EJ : **BHK_{ras}**
- Cellules NIH 3T3 : **NIH**
- Cellules NIH transfectées avec le plasmide pSV2 *neo* : **NIH_{neo}**
- Cellules NIH transfectées avec le plasmide pSV2 *c-Ha-ras* EJ : **NIH_{ras}**

Dans les figures, la radio-activité des fractions est exprimée en % du total. Certains chromatogrammes font apparaître l'absorbance UV à $\lambda = 206$ nm, également exprimée en % du total (unité arbitraire par rapport au zéro optique, réglé sur l'eau). Les interpolations présentées ont été réalisées à l'aide d'un logiciel Cricket Graph sur ordinateur Macintosh Plus (Apple).

A. OBTENTION DES SOUCHES ET DES CLONES TRANSFORMES

1. Cellules BHK et BHK/HSV

Les cellules BHK (figure 20) et BHK/HSV ont été fournies au laboratoire par le Pr L. Montagnier (Institut Pasteur de Paris) au 16^e passage. Elles ont été maintenues en culture par Mme M. Coniez, que nous remercions vivement.

En vue des tests analytiques, 4 flacons de 175 cm² de chaque type cellulaire ont été marqués métaboliquement à la glucosamine (³H ou ¹⁴C, voir Chapitre II).

2. Cellules BHK_{neo} et BHK_{ras}

Les cultures initiées à partir d'ampoules conservées dans l'azote liquide nous ont servi à transfecter les plasmides pSV2_{neo} et pSV2 *c-Ha-ras* EJ. Nous avons procédé à la transfection de 10 à 20 boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Après passage dans des boîtes de 100 mm, nous avons effectué la sélection des clones résistants à l'antibiotique G418, à la concentration de 0,8 mg/ml, ce qui a fourni des colonies de cellules BHK *neo* (figure 20) et BHK *ras* (figure 20) (soit environ 50 à 100 colonies par boîte, qui ont été rassemblées par trypsinisation au 20^e jour de la sélection, et entretenues par passage au tiers tous les deux à trois jours).

L'analyse génomique de ces cellules, effectuée par hybridation moléculaire, a permis de confirmer la présence des gènes introduits par transfection (figure 21). Dès le 5^e passage, les cultures ont été amplifiées et des séries de 2 à 3 boîtes de chaque type cellulaire ont été congelées dans des ampoules en verre, conservées dans l'azote liquide.

3. Cellules NIH 3T3

Les fibroblastes murins NIH 3T3 (figure 22) nous ont été fournis et maintenus en culture par Mr C. Lagrou que nous remercions vivement. Ils proviennent des stocks de cellules du Service d'Oncologie Moléculaire (Institut Pasteur de Lille).

4. Cellules NIH $_{neo}$ et NIH $_{ras}$

Nous avons procédé à la transfection du plasmide pSV2 $_{neo}$ dans les cellules NIH, afin d'obtenir des cellules NIH $_{neo}$ (figure 22) qui nous ont servi de référence pour les cellules NIH $_{ras}$ (figure 22) au cours des études *in vivo*. Ces dernières cellules avaient été obtenues par transfection du plasmide pSV2 c-Ha-*ras* EJ dans les fibroblastes NIH, réalisée au laboratoire ci-dessus par V. Laudet. Elles nous ont été fournies par le Dr S. Saule, que nous tenons à remercier.

Nous avons procédé à une seconde sélection de ces cellules par 0,8 mg/ml de G418, ainsi qu'à l'analyse génomique par hybridation moléculaire (voir figure 1 du mémoire soumis à publication), afin de nous assurer de la présence du gène *ras* dans le génome. Nous avons vérifié, par la même technique, la présence du gène *neo* dans les cellules NIH $_{neo}$.

B. ETUDES *IN VIVO*

Avant d'entreprendre des analyses structurales d'oligosaccharides, il nous a paru utile d'étudier le comportement *in vivo* des différents types cellulaires. Dans ce but, nous avons évalué la tumorigénicité et la capacité des cellules tumorales à former des métastases après injection dans des Souris athymiques (Souris "nude") et dans des Hamsters (voir Chapitre II pour les protocoles).

1. Etude du modèle BHK/BHK $_{ras}$ chez la Souris athymique

Une première expérience a été réalisée sur des groupes de trois animaux pour chacun des trois types cellulaires de ce modèle (cellules BHK, BHK $_{neo}$ et BHK $_{ras}$). Nous avons injecté 10^6 cellules BHK, 10^6 cellules BHK $_{neo}$ et $0,5 \cdot 10^6$ cellules BHK $_{ras}$; nous voulions mettre en évidence des différences de tumorigénicité entre ces trois types cellulaires.

Cette expérience a échoué, puisque les trois types cellulaires ont fourni des tumeurs de taille équivalente (diamètre de 2 à 2,5 cm) dans toutes les Souris, au bout de 20 jours. Toutefois, dans la mesure où nous avons injecté $0,5 \cdot 10^6$ cellules BHK $_{ras}$, l'expression de l'oncogène peut être considérée comme responsable en partie d'une tumorigénicité accrue (mais non "mesurable") de ces cellules, les tumeurs produites par celles-ci ayant la même taille que celles produites par les cellules de référence, injectées en quantité double.

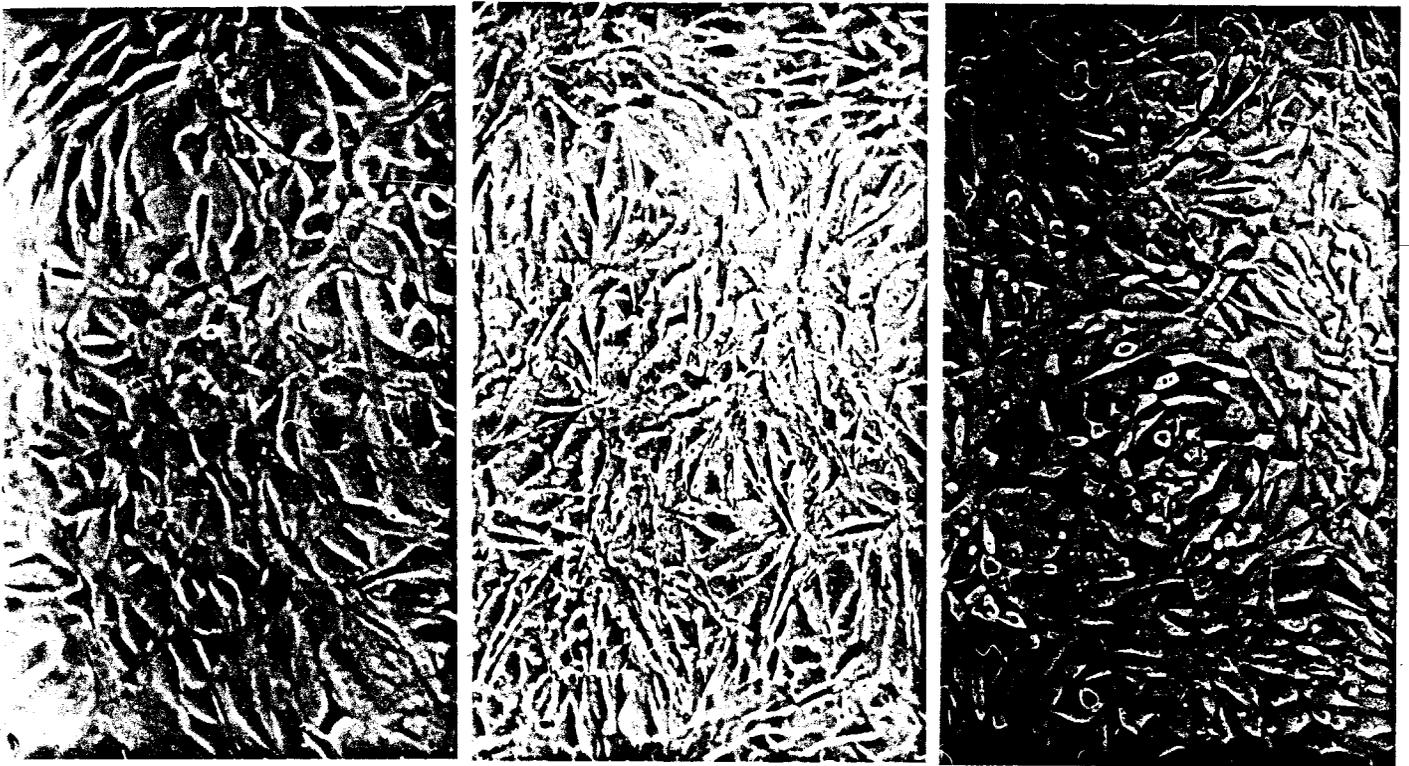


Figure 22 : Aspect en culture des cellules du modèle NIH (NIH 3T3, NIHneo et NIHras) x 120.
Noter le changement de morphologie chez les cellules NIHras.

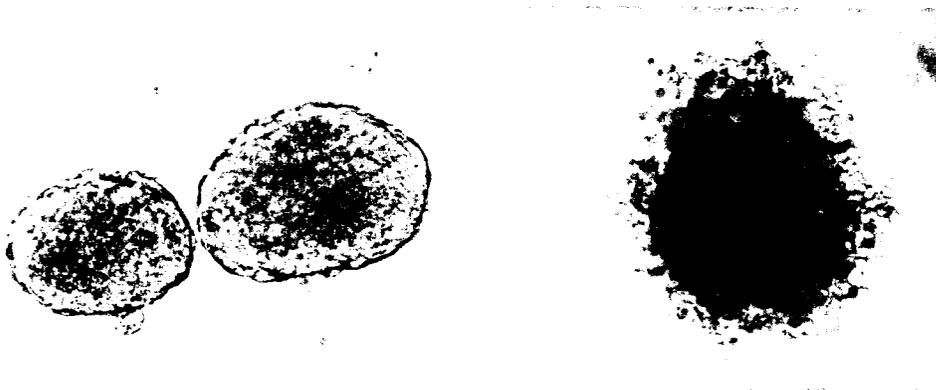


Figure 23 : Clonage des cellules BHK 21/C13 en milieu semi-solide. Les clones présentés ont été photographiés au 18^e jour de culture (x 120).

2. Etude du modèle BHK/BHK_{ras} chez le Hamster

Nous avons entrepris la même étude dans un système homologue, en injectant $0,5 \cdot 10^6$ cellules BHK, $0,5 \cdot 10^6$ cellules BHK_{neo} et $0,2 \cdot 10^6$ cellules BHK_{ras} dans trois groupes de trois Hamsters.

Au cours des 8 semaines suivant l'injection, nous avons pu assister à la croissance progressive de tumeurs. Pendant la huitième semaine, l'aspect moribond des animaux et la mort de l'un d'entre eux (ayant reçu des cellules BHK_{neo}), nous a incité à arrêter l'expérience, en sacrifiant les Hamsters.

L'observation anatomique a montré la présence de fibrosarcomes spongieux sous-cutanés au site de l'injection, qui étaient fortement vascularisés, chez tous les animaux. Certaines tumeurs apparurent invasives dans l'abdomen, sans qu'une corrélation inter- ou intra-groupes puisse être établie, traduisant donc probablement des injections accidentelles de cellules dans la cavité abdominale. Les tailles des tumeurs furent comparables, ne permettant pas de mettre en évidence une tumorigénicité différentielle des différents types cellulaires injectés. Les tumeurs produites par les cellules BHK_{ras} semblèrent toutefois mieux développées et mieux vascularisées.

Les cellules BHK n'ont produit aucune tumeur métastatique décelable à l'observation macroscopique. Les cellules BHK_{neo} ont produit une métastase sous-hépatique unique chez un des trois Hamsters du groupe. En revanche, les trois animaux ayant reçu des cellules BHK_{ras} portaient de multiples métastases, macroscopiquement visibles, de 2 à 5 mm de diamètre, à localisations hépatique, rénale, splénique et pulmonaire, les poumons apparaissant complètement envahis par des nodules.

Nous avons procédé à la photographie des étapes de l'observation anatomique, à l'analyse histologique des tumeurs et à la mise en culture d'explants des tumeurs et des organes envahis, afin de conserver le maximum de matériel cellulaire en vue d'études ultérieures.

Cette expérience nous a permis de conclure quant à l'implication de l'oncogène *ras* activé dans l'acquisition de potentialités métastatiques par les cellules qui l'expriment. De même, en accord avec l'observation de Kerbel déjà évoquée, la transfection du gène *neo* s'est avérée responsable de l'acquisition d'une capacité métastatique par les cellules BHK_{neo}. Une seconde conclusion porte sur les cellules elles-mêmes ; au vu de ces résultats, nous avons décidé de comparer la glycosylation membranaire des cellules BHK et BHK_{ras} au cours de notre recherche de marqueurs oligosaccharidiques de la malignité. Une troisième conclusion découle de cette expérience : les cellules BHK, que nous avons considéré comme "normales" (au sens de "non transformées") ne le sont visiblement pas, puisqu'elles se sont avérées tumorigènes, aussi bien dans des conditions hétérologues (chez la Souris albinos) que dans des conditions homologues (chez le Hamster).

Ce dernier point nous a conduit à vérifier un autre critère de transformation des cellules BHK, à savoir la capacité à former des clones en milieu semi-solide. Nous avons procédé au clonage de ces cellules (selon la technique exposée dans le Chapitre II), ce qui a fourni des clones au bout de 15 à 18 jours d'incubation (figure 23).

Les cellules BHK utilisées répondent donc à deux principaux critères de transformation : elles "clonent" en agar et sont tumorigènes *in vivo*, ce qui n'était pas le cas des cellules d'origine (voir Chapitre I). Ceci pose le problème de la "normalité" d'une cellule de référence, qui sera abordé dans la "Discussion Générale". Les cellules BHK dont nous disposons ne sont à l'évidence pas "normales"; en revanche, dans la mesure où elles s'avèrent incapables de produire des métastases *in vivo*, elles peuvent servir de référence pour les études structurales des glycanes synthétisés par les cellules BHK ras .

3. Mise au point de l'étude *in vivo* du modèle NIH/NIH ras chez la Souris athymique

Nous avons évalué la tumorigénicité *in vivo* des cellules NIH, NIH neo et NIH ras en injectant ces cellules à des Souris "nude", ce qui nous a permis de "prendre en main" le modèle et d'affiner le protocole expérimental, en vue d'une étude plus approfondie.

Au cours d'une première expérience, nous avons injecté 10^6 cellules NIH, 10^6 et 10^5 cellules NIH ras dans trois groupes de trois animaux. Les Souris ont été observées quotidiennement pendant 20 jours.

Les cellules NIH n'ont donné naissance à aucune tumeur visible au site d'injection, durant la période d'observation. Les trois animaux de ce groupe ont été gardés en observation pendant trois semaines supplémentaires sans que l'apparition de tumeurs puisse être observée.

Les cellules NIH ras ont produit des tumeurs de taille variable, allant de 0,5 à 3,5 cm selon les animaux et la quantité de cellules injectées. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence liée au nombre de cellules injectées, à cause de la trop grande disparité des tailles des tumeurs. Comme ce fut le cas lors de l'étude chez le Hamster du modèle BHK/BHK ras , certaines tumeurs se sont avérées invasives, sans qu'une corrélation puisse être établie. Il est probable que ces invasions soient dûes à des injections accidentelles de cellules dans la couche musculaire dorsale, étant donné que les injections ont été réalisées sans anesthésier les animaux.

De même, nous n'avons pas pu mettre en évidence des métastases macroscopiquement visibles à l'examen anatomique, au cours de cette expérience de mise au point. Une explication possible de ce fait tient au nombre de cellules injectées : au vu des résultats, nous avons décidé d'injecter 10^4 cellules NIH ras seulement au cours de l'étude suivante, afin de "laisser le temps" aux cellules tumorales de produire des métastases. En effet, les tumeurs provoquées par l'injection d'un nombre plus grand de cellules deviennent rapidement une charge difficilement supportable pour les animaux. Nous avons pensé que, puisque la cellule NIH ras est tumorigène, elle doit manifester cet effet même lorsque très peu de cellules sont injectées.

4. Mise en évidence de cellules métastatiques *in vivo*

Dans une seconde expérience, nous avons pu mettre en évidence la capacité métastatique des cellules NIH ras . Nous avons injecté 10^6 cellules NIH à trois animaux témoins, 10^5 cellules NIH neo à un autre groupe de trois témoins et 10^4 cellules NIH ras à sept animaux-test.

Les cellules NIH et NIH neo n'ont pas produit de tumeurs sur une période d'observation de 14 semaines au total. Ce point nous place en désaccord avec les résultats du groupe de Kerbel (voir

ci-dessus) quant à la progression maligne chez les cellules transfectées par le gène *neo* à l'aide de la technique au phosphate de calcium.

Les animaux ayant reçu des cellules NIH*ras* ont commencé à produire des tumeurs visibles au bout de trois semaines (taille des nodules sous-cutanés de 1 à 2 mm). Pendant la sixième semaine après l'injection, une des Souris est morte et fut dévorée par les autres occupants de la cage ; elle portait une tumeur de 3,5 à 4 cm. Nous avons décidé de laisser les autres animaux développer des tumeurs de cette taille avant de les sacrifier ; les dernières Souris ont atteint ce stade au cours de la huitième semaine après l'injection. Afin d'éviter que les animaux ne meurent dans l'isolateur, nous les avons sacrifiés progressivement, en fonction de leur état, jugé critique à partir du moment où la locomotion est insuffisante pour que l'animal puisse atteindre la nourriture.

L'examen anatomique des viscères n'a révélé aucune métastase visible à l'œil nu. Les poumons des animaux ayant cependant un aspect inhabituel, nous avons soupçonné l'invasion métastatique. Afin de lever l'ambiguïté, nous avons procédé à la mise en culture de fragments pulmonaires d'une des Souris ; la sélection *in vitro* de cette co-culture par l'antibiotique G418 révéla la présence d'un grand nombre de cellules résistantes, possédant donc le gène *neo*, et qui ont rapidement formé des colonies de cellules en apparence identiques aux cellules NIH*ras* de départ. L'analyse génomique par hybridation moléculaire des cellules de la tumeur primaire portée par l'animal, ainsi que de ces cellules métastatiques re-sélectionnées, a montré la présence du gène *ras* dans les deux types cellulaires (l'analyse génomique est présentée et discutée dans le mémoire soumis à publication ci-dessous).

En conclusion de cette expérience, l'acquisition du phénotype malin par les cellules contenant l'oncogène est démontrée, de même que la colonisation pulmonaire par ces cellules. Au vu du résultat, nous avons choisi les cellules métastatiques obtenues après cette seconde sélection pour la recherche de marqueurs oligosaccharidiques.

C. ETUDE DE L'ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE

Nous avons porté notre attention sur la sialylation, en étudiant l'activité sialyltransférase des différents types cellulaires décrits ci-dessus : cellules NIH, NIH*ras* transfectées, NIH*ras* de la tumeur primaire (NIH*ras*-T) et NIH*ras* métastatiques (NIH*ras*-m) sur un accepteur exogène, l'asialofétuine. Les résultats obtenus ont fait l'objet du mémoire suivant, soumis à publication à *Biochemical Journal* :

Ces résultats sont à compléter par les profils d'élution chromatographique des glycopeptides pronasiques radio-marqués totaux sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (figure 24) et des fractions 36 à 100 de ce fractionnement (N-glycosylpeptides) sur colonne de ConA immobilisée (figure 25).

Metastatic capacity of NIH 3T3 cells transfected with the c-Ha-ras EJ oncogene is correlated with enhanced sialyltransferase activity and high Asn-linked glycan antennarization.

Haris Cazlaris¹, Philippe Delannoy¹, Vincent Laudet², Christian Lagrou² and Jean Montreuil^{1,3}.

¹. Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Associée au CNRS n° 217), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

². Unité d'Oncologie Moléculaire (Unité INSERM n° 186 et Unité Associée au CNRS n° 0156), Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France.

³. To whom correspondance should be addressed.

Abstract : The implication of the c-Ha-ras oncogene in alterations of cell surface glycosylation in relation to cancer metastases has been studied. After transfection of the transforming gene into NIH 3T3 cells, we evaluated tumorigenicity, metastatic capacity in vivo, composition of cell glycopeptides and sialyltransferase activity of cell homogenates toward asialofetuin. Our results indicate that Asn-linked glycans present a higher branching antennarization which can be correlated with an enhancement of the sialic acid transfer capacity in transformed cells. The malignant transfectants obtained after one passage into nude mice present an even greater sialyltransferase activity.

Key words : c-Ha-ras EJ oncogene, sialyltransferase, metastasis, Asn-linked glycans, NIH 3T3 cell.

Abbreviations : PBS, phosphate-buffered saline; Neu5Ac, N-5 acetylneuraminic acid; MEM, minimum Eagle's medium; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; ConA, Concanavalin A.

1. INTRODUCTION

Malignant transformation of eukaryotic cells correlates with several alterations of their biological behaviour. Glycosylation in particular is typically altered in transformed cells [13]. The molecular basis of the transformation process is still unknown, as well as the events leading to the observed alterations in cell glycosylation.

These changes reflect modifications of glycan biosynthesis, which is modulated by the genetic expression of glycosyltransferases or/and by a misregulation of their activities.

During the last few years, oncogene transfection studies revealed the possible implication of such genes in metastasis [8]. In a most recent study, Bolscher *et al.* [1], reported alteration of cell surface carbohydrate related with invasive potential after ras transfection. Metastasis is also considered as a phenomenon involving cell membranes [10] and cell surface glycosylation [3].

This work is part of a program attempting to associate modifications of glycosylation and glycosyltransferase activities of tumor cells with malignant transformation [2]. In this paper we studied tumorigenicity, glycopeptide composition and sialyltransferase activity of c-Ha-ras transfected NIH 3T3 cells.

2. MATERIALS AND METHODS.

2.1. Chemicals

All reagents were of analytical grade. CMP-[U-¹⁴C]-Neu5Ac (262 mCi/mmol [9.69 GBq/mmol]) as well as [³H]- and [¹⁴C]-glucosamine hydrochloride (respectively 38 Ci/mmol [1.41 TBq/mmol] and 58.7 mCi/mmol [2.18 GBq/mmol]) were from Amersham Labs (Amersham, U.K.). CMP-Neu5Ac,

2,3-dehydro-2-deoxy-Neu5Ac and fetuin were from Sigma Chem. Comp. (St Louis, USA).

2.2. Cell culture and metabolic labelling

NIH 3T3 cells, pSV2neo- and c-Ha-ras EJ- transfectants (respectively termed NIH-neo and NIH-ras) were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS (Gibco) and antibiotics (D10FCS). All cultures, as well as transfections, were performed on Falcon plastic petri dishes or flasks, at 37°C, in a humid atmosphere of 5% CO₂ in air. Cells were passaged every 3 days by trypsinization. Confluent cultures were harvested by scraping in Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-free PBS.

Upon the last passage before harvesting, four 175 cm² flasks were supplemented each with 125 µCi 6-[³H]D-glucosamine (NIH 3T3 cells) or 75 µCi 2-[¹⁴C]D-glucosamine (NIH-ras cells) in the medium, in order to label N-acetyllactosaminic type glycans synthesized by the cells.

2.3. Tissue culture

Fragments of primary tumors and lungs were dilacerated with fine scissors and placed into 100-mm petri dishes in D10FCS. 3 to 5 days later, attached cells and explants were trypsinized and passaged routinely every 3 days.

2.4. Transfections and DNA analysis

Exogenous plasmids DNA pSV2neo [14] and human c-Ha-ras EJ [15] were provided by Dr S. Saule. Transfections were carried out by the calcium phosphate-DNA coprecipitate method of Graham and Van der Eb [5], with minor modifications.

Selection was performed by replacing the medium with 800 µg/ml geneticine sulfate G418 (Gibco) in D10FCS [14]. Resistant clones were

pooled 15 days later by trypsinization and passaged routinely every 3 days.

DNA from 10^7 cells of each line was extracted and DNA analysis performed as described [7] by restriction endonuclease digestion, agarose electrophoresis of the fragments and Southern blot hybridisation with a nick-translated probe obtained by Bam H1 digestion of the plasmid pSV2neo EJ [15]. Autoradiography was carried out on X-Omat S film (Kodak) for 48 hrs, at -70°C .

2.5. *Animals*

7-week old female Balb C nu/nu mice (IFFA-Credo, Grenoble, France) received subcutaneously in the back 10^6 NIH 3T3 or 10^5 NIH-neo or 10^4 NIH-ras cells in individual injections of 0.2 ml in DMEM. Animals were given food and water ad libitum and were exposed to a light/darkness cycle of 12/12 hrs. They were sacrificed 5 to 9 weeks later, and their organs examined macroscopically for metastases. Fragments of the primary tumors and lungs of NIH-ras-injected mice were established in culture as described.

2.6. *Fractionation of glycopeptides*

Labelled cells were washed twice in PBS and delipidated as described [9]. Pronase digestion of the pellet was carried out to yield glycopeptides, which were desalted on Bio-Gel P2 (Bio-Rad Laboratories) and fractionated on ConA-Sepharose 4B (Pharmacia)[8]. Elution was performed stepwise with 0.01 M and 0.5 M α -methyl glucoside (Sigma). Radioactivity of the fractions was counted on a Beckman LS 3801 counter.

2.7. *Preparation of cell homogenates*

Cells were harvested at confluency, washed three times in cold

Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-free PBS and scraped off in buffer. They were then centrifuged at 1,500 x g for 5 min and washed twice in sodium cacodylate 25 mM / NaCl 0.154 M pH 6.5 buffer. The cell pellets were resuspended in the same buffer and homogenized during 15 sec with a Sonifier cell disrupter.

The insoluble particles were removed by centrifugation at 4°C and 10,000 x g for 30 min. Supernatants were either used immediately for the transferase assays or kept frozen at -20°C. The protein concentration was determined with the Bio Rad Protein Assay (Bio Rad Lab., München, West-Germany).

2.8. Preparation of the acceptor

Fetuin was desialylated by mild acid hydrolysis with trifluoroacetic acid 0.1 N, at 80°C for 40 min, according to Zanetta and Gombos [17]. Trifluoroacetic acid and Neu5Ac were eliminated by extensive dialysis against distilled water. To confirm total desialylation, sugar analysis was carried out by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [9].

2.9. CMP-Neu5Ac : glycoprotein sialyltransferase assay

Each assay was performed with duplicate samples of cell homogenates. The results were expressed as mean values.

The standard enzyme reaction mixture contained, in a final volume of 100 µl, 50 µl of cell homogenates (5-10 mg/ml of protein), 0.69 nmol of CMP-[U-¹⁴C]-Neu5Ac (4.4 x 10⁵ dpm), 30 nmol of non-radioactive CMP-Neu5Ac (final concentration : 255 µM), 1 mM 2,3-dehydro-Neu5Ac as inhibitor of neuraminidase, sodium cacodylate 25 mM, NaCl 0.154 M, pH 6.5 buffer and asialofetuin to a final concentration of 2.5 mg/ml (concentration of terminal galactose residues of 2.0 mM).

After incubation at 37°C, the reaction was stopped by addition of 1 ml of ice-cold 5 % phosphotungstic acid in HCl 2 N. The samples were washed on glass wool filters, twice with 5 ml of 5 % trichloroacetic acid, twice with distilled water and finally with ethanol. After drying, the radioactivity of the filters was measured in a toluene-based scintillation mixture.

Sialyltransferase activity was expressed as exogenous activity by calculating the difference between total (in the presence of acceptor) and endogenous activity. Assay results were expressed as pmol of NeuAc transferred per mg of protein per hour.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Animals and cells*

Transfection of pSV2neo or pSV2 neo EJ into NIH 3T3 cells followed by G418 selection yielded 10 to 50 colonies per dish. These were pooled as described and used to inject animals. As recently reported by Kerbel and coworkers [6], the calcium phosphate transfection procedure affects cell tumorigenic behavior. In our system, NIH-neo cells provided a negative control of the neo gene's implication in the tumorigenicity of NIH-ras cells.

10^6 NIH 3T3 or 10^5 NIH-neo cells failed to produce tumors in groups of 3 control animals, during the 9-week observation period. The control mice were kept under observation for an additional 4-week period and still no tumor appeared. On the other hand, 5 to 9 weeks after injection, 10^4 NIH-ras cells produced large primary tumors at the site of injection in all 11 test mice. No metastasis was macroscopically detected in the lungs, kidneys or livers of these mice.

Several studies on the tumorigenicity of NIH-ras cells suggest that

metastases are formed in the lungs [11]. In our experiments, we only detected micrometastases by culturing lung fragments of tumor-bearing mice and subjecting the cultures to G418 selection. This yielded drug-resistant colonies of cells morphologically similar to NIH-ras. These cells, as well as G418-resistant NIH-ras cells from the primary tumors, were assayed for sialyltransferase activity.

Southern blot analysis of the various cell lines showed that the human c-Ha-ras EJ probe does not cross-hybridize with the endogenous c-ras of NIH 3T3 cells (Fig.1,II-A) and proved the presence of activated c-Ha-ras EJ in all transformed lines, as indicated by the expected 6.6 kb band upon digestion with Bam H1 (Fig.1,II). The analysis of clonality was performed with Kpn 1 digestion, which cleaves the introduced gene only once (Fig.1,I). This revealed (Fig.1,II-B) that the original NIH-ras transfectants, resulting from a pool of colonies, behaved as a single clone.

The cell populations from both the primary tumor and the micrometastatic nodules were also clonal. The presence of additional bands smaller than 6.6 kb in the Bam H1 digests (major bands at 6.6 kb, 4.5 kb, 3.0 kb), suggested that some rearrangements of the oncogene may have occurred in the tumor cell line (Fig.1,II-C) during the in vivo passage. The same pattern was observed in the metastatic line (Fig.1,II-D), as indicated by an equivalent relative intensity of the bands.

This observation strongly suggests that the metastatic cells derived, as expected, from the primary tumor which itself derived, at least majoritarily, from a single rearranged clone.

We conclude that the tumorigenic and metastatic capacity of the transfectants is related to the presence of ras. Further work is in progress to determine the effect of the observed rearrangement on the cell phenotype.

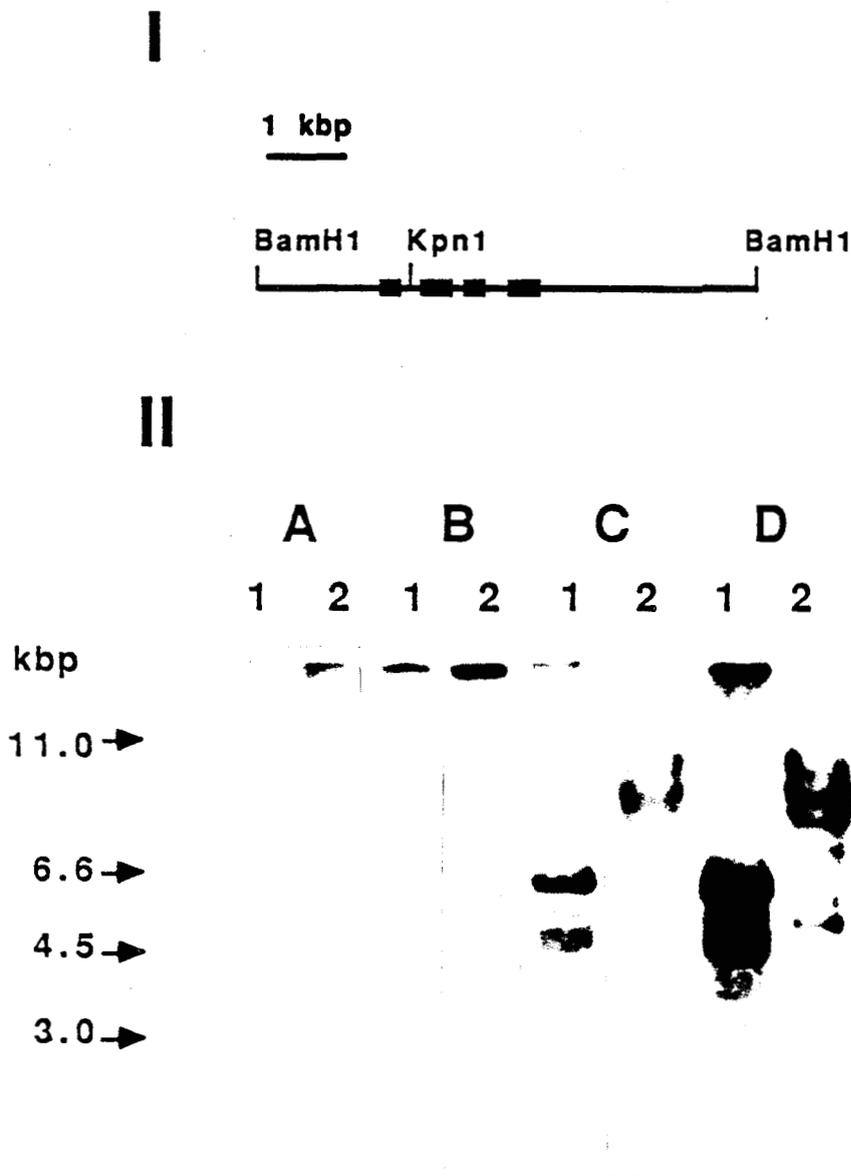


Figure 1. (I): Genetic map of the pSV2 neo EJ plasmid; black boxes represent ras exons. (II): Detection of human c-Ha-ras EJ gene by Southern blot analysis. Digestions are as follows: Lanes A, NIH 3T3; B, NIH-ras transfectant; C, NIH-ras from the primary tumor; D, metastatic NIH-ras. Numbers refer to Bam H1 (1) and Kpn 1 (2) digestions. The blot was hybridised with the ras probe described in the text.

3.2. Fractionation of glycopeptides

Labelled glycopeptides were cofractionated into 3 peaks by ConA (Table 1). We observed a 15 % decrease of the weakly bound fraction (FEC 0.01 M, containing biantennary glycopeptides) from NIH-ras cells compared to NIH 3T3, whereas the lectin-unbound fraction (FNRC) is increased by 7 %. This fraction contains highly branched glycopeptides, directly associated with metastasis [4]. The FNRC / FEC 0.01 M ratio, indicating the relative increase in branching is enhanced 1.22-fold. A decrease of 16 % was also observed in the strongly bound fraction (FEC 0.5 M) containing oligomannose-type glycopeptides.

Multiantennarisation of cell Asn-linked glycopeptides is a typical feature of transformed cells. Our results confirm previous data by Santer and coworkers [12] in this particular system.

3.3. Sialyltransferase activities

We carried out further analysis of the glycosylation pattern of NIH-ras cells, by assaying sialyltransferase activity (Fig.2). The apparent capacity of the different cell homogenates to transfer [¹⁴C]-NeuAc onto asialofetuin is : NIH 3T3 and NIH-neo, 2.35 ± 0.10 and 2.30 ± 0.16 nmol/mg.h respectively; NIH-ras transfectants, 4.50 ± 0.50 nmol/mg.h (increased 1.90-fold); NIH-ras from the primary tumor, 6.45 ± 0.65 nmol/mg.h (increased 2.75-fold); metastatic NIH-ras, 6.30 ± 2.05 nmol/mg.h (increased 2.65-fold).

We show that pSV2neo transfection does not affect NeuAc transfer capacity of NIH 3T3 cell homogenate. Keeping in mind that NIH-neo cells are not tumorigenic after injection into nude mice during the observation period, we can assume that calcium phosphate transfection by itself was not sufficient for malignant transformation of NIH 3T3 cells. Such a transformation would have induced a larger increase in the NeuAc trans-

Table 1 Percentages of fractions obtained by Con-A Sepharose affinity chromatography of N-acetyllactosaminic type glycopeptides

	FNRC	FEC 0.01 M	FEC 0.5 M
NIH 3T3	70.1	15.8	13.6
NIH- <u>ras</u>	75.3	13.2	11.6

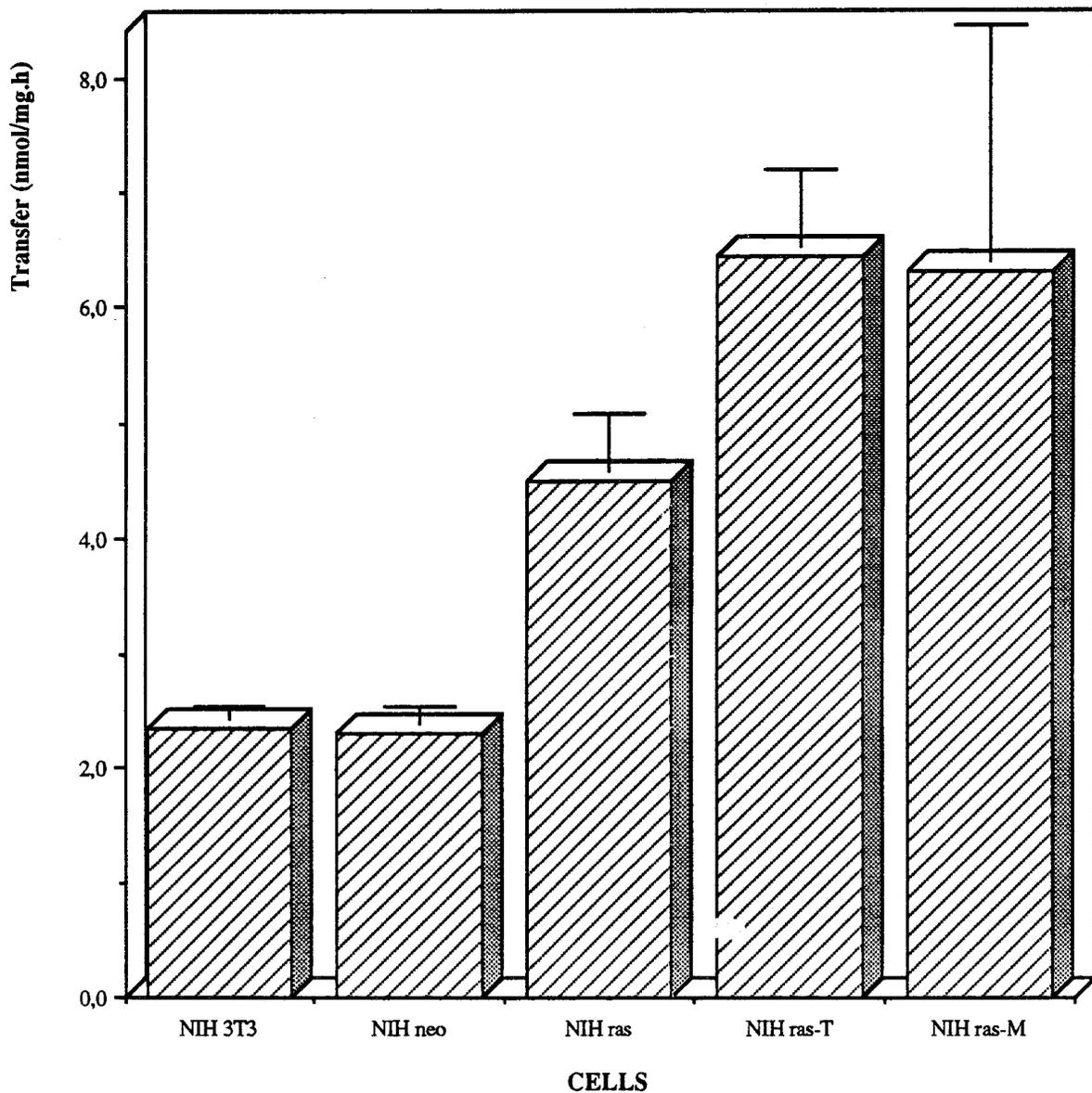


Figure 2. Transfer of [^{14}C]-Neu5Ac onto asialofetuin. Results are expressed as the mean of duplicate measurements, in pmol of Neu5Ac transferred per mg of protein and per hour. See text for assay details.

fer capacity. Cells selected for enhanced metastatic potential by serial passages into nude mice [11,16] should present an even greater NeuAc transfer. Further studies are required to prove this hypothesis.

4. CONCLUDING COMMENTS

We conclude that transfection of the Ha-ras oncogene is actually responsible for cell transformation, which is associated with Asn-linked glycan branching and sialyltransferase activity enhancement.

By introducing the ras oncogene into NIH 3T3 cells, we observed modifications of the glycosylation pattern similar to those previously described in other systems of virally or chemically transformed cells. Bolscher et al. report similar results with a different transfection procedure [1].

For the moment, little is known about the regulatory system of glycosyltransferases. The study of pathological or experimentally modified cells may improve our understanding of the control of these pathways. The mechanism by which ras transfection induces modifications of sialyltransferase and N-acetylglucosaminyltransferase V activity has to be defined by further work. The implications of other transforming genes and the mechanisms of their eventual effect on the same enzymes could improve our understanding of cell transformation.

Aknowledgements : The authors wish to thank Drs S. Saule and J. Coll for valuable comments and discussion, J.-P. De Cavel for expert technical assistance with mice injections, M.-B. Raes for help with preparation of Fig.1 and Pr D. Stehelin for kindly accepting H. C. in his lab.

This work was supported in part by grants from the CNRS (UA 217 and UA 0156) and INSERM (U 186).

REFERENCES

- [1] Bolscher, J. G. M., Van der Bijl, M. M. W., Neefjes, J. J., Hall, A., Smets, L. A. and Ploegh, H. L. (1988) *EMBO J.* 7, 3361-3368.
- [2] Debray, H., Qin, Z., Delannoy, P., Montreuil, J., Dus, D., Radzikowski, C., Christensen, B. and Kieler, J. (1986) *Int. J. Cancer* 37, 607-611.
- [3] Dennis, J. W. and Laferté, S. (1987) *Cancer Metast. Rev.* 5, 185-204.
- [4] Dennis, J. W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. and Kerbel, R. (1987) *Science* 230, 582-585.
- [5] Graham, F. L. and Van der Eb, A. J. (1973) *Virology* 52, 456-467.
- [6] Kerbel, R. S., Waghorne, C., Man, M. S., Elliott, B. and Breitman, M. L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1263-1267.
- [7] Maniatis T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- [8] Mareel, M. M. and Van Roy, F. M. (1986) *Anticancer Res.* 6, 419-436.
- [9] Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. and Strecker, G. (1986) in *Carbohydrate analysis : a practical approach*, M. F. Chaplin and J. F. Kennedy Eds, IRL Press, Oxford, pp 143-204.
- [10] Nicolson, G. L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 695, 113-176.
- [11] Nicolson, G. L. (1987) *Adv. Viral Oncol.* 6, 143-168.
- [12] Santer, U. V., Gilbert, F. and Glick, M. C. (1984) *Cancer Res.* 44, 3730-3735.
- [13] Smets, L. A. and Van Beek, W. P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 738, 237-249.

- [14] Southern, E. M. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341.
- [15] Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R. and Chang, E. H. (1982) *Nature* 300, 143-149.
- [16] Thorgeirsson, U. P., Turpeenniemi-Hujanen, T., Williams, J. E., Westin, E. H., Heilman, C. A., Talmadge, J. E. and Liotta, L. A. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 259-262.
- [17] Zanetta, J. P. and Gombos, G. (1974) *FEBS Lett.* 47, 276-278.

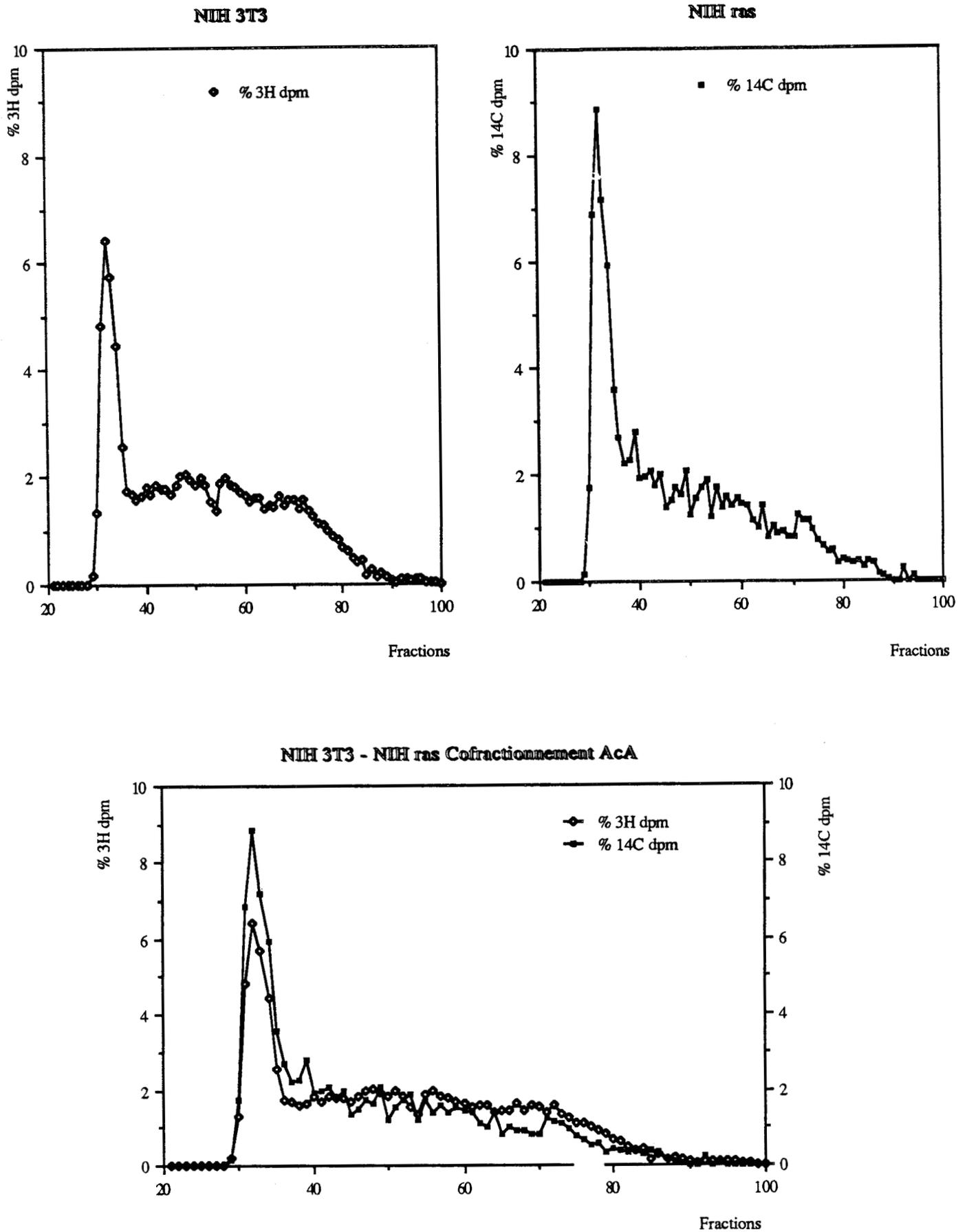


Figure 24 : Co-chromatographie analytique de gel-filtration des glycopeptides pronasiques totaux de cellules NIH 3T3 et NIHras sur colonne d'Ultrogel AcA 202. Noter les différences du profil d'éluion. Les conditions opératoires sont précisées dans le Chapitre II.

NIH 3T3 - NIH ras Cofractionnement ConA

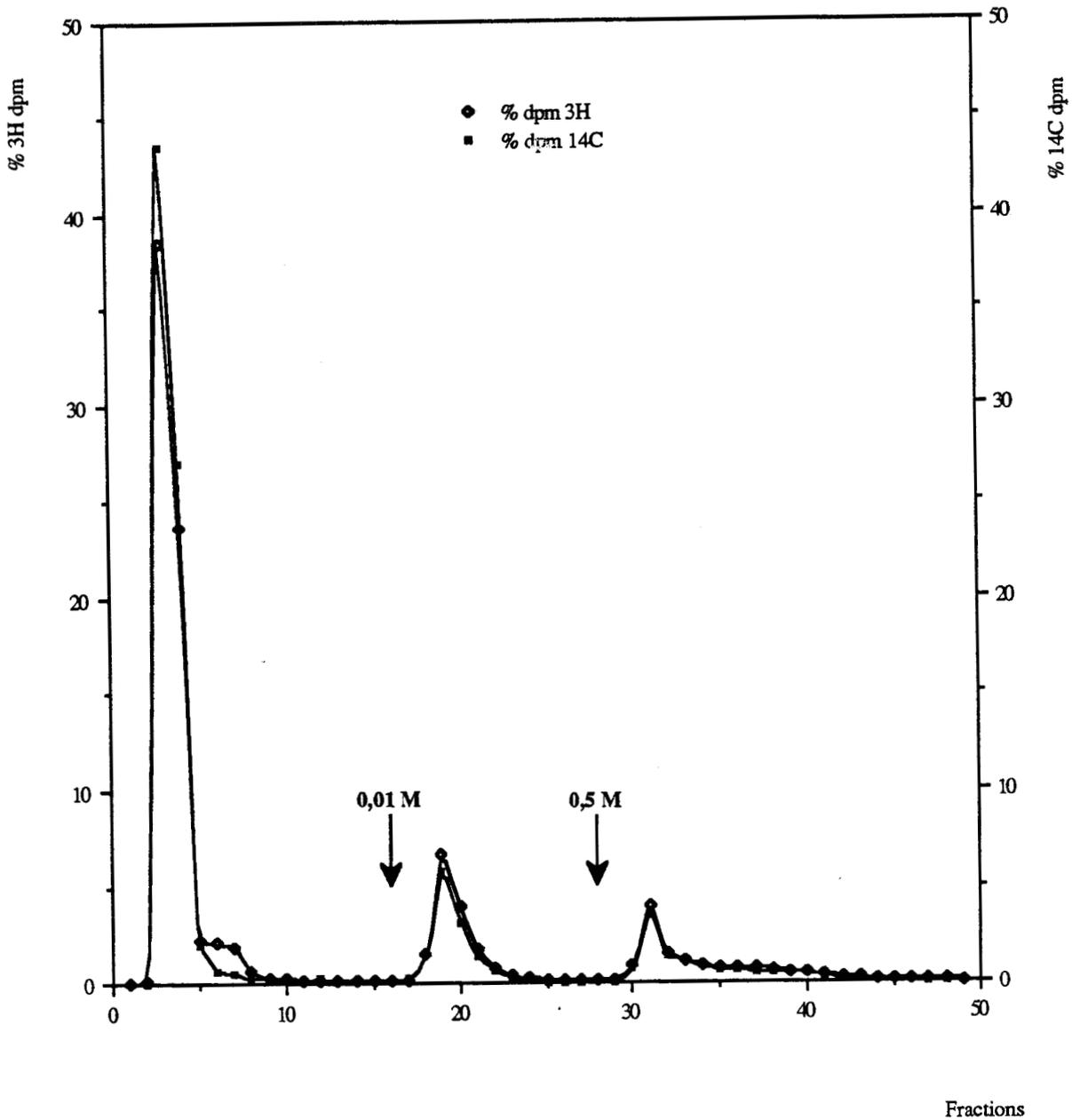


Figure 25 : Co-chromatographie d'affinité des N-glycosylpeptides de cellules NIH 3T3 et NIHras, provenant du fractionnement par gel-filtration, sur colonne de ConA immobilisée. Les conditions opératoires sont précisées dans le Chapitre II. La molarité du glucoside utilisé pour l'éluion est indiquée par les flèches.

La même étude a été menée sur les cellules BHK_{neo} et BHK_{ras} (figures 26 et 27). L'activité sialyltransférase des cellules BHK et BHK_{ras} a été en outre mesurée par le même protocole (figure 28) sur trois accepteurs différents ; les résultats obtenus montrent que cette activité est multipliée par 2,5 en moyenne dans les cellules exprimant l'oncogène (figure 29), ce qui confirme les conclusions de notre étude dans le système NIH/NIH_{ras}.

D. PREPARATION ET FRACTIONNEMENT DE GLYCOPEPTIDES

Dans tous les cas, quel que soit le mode de production, nous avons délipidé séparément le matériel radio-marqué. Les glycopeptides préparés par digestion pronasique ont été mélangés à la préparation radio-active après action de la pronase sur cette dernière, et avant la première étape de tamisage moléculaire (cellules BHK et BHK/HSV). Les glycopeptides préparés par hydrolyse alcaline dans des conditions réductrices ont subi l'hydrolyse en présence du matériel radio-actif préalablement délipidé (cellules BHK_{ras}, NIH et NIH_{ras-m}).

Les quantités de cellules produites ont été de l'ordre de 10^9 , ce qui équivaut à :

- 200 flacons de 175 cm² (dont 8 flacons radio-marqués au tritium) et 6 unités double-tray de cellules BHK/HSV.

- 160 flacons de 175 cm² (dont 6 flacons radio-marqués au tritium), 2 litres de culture sur microporteurs Cytodex (correspondant à 2 grammes de microporteurs secs) et 8 unités double-tray de cellules BHK.

- 6 litres de culture sur Cytodex et 6 flacons radio-marqués au ¹⁴C de cellules BHK_{ras}.

- 4 litres de culture sur Cytodex, 6 bouteilles "rollers" (réutilisés une fois) et 6 flacons radio-marqués au ¹⁴C de cellules NIH_{ras-m}.

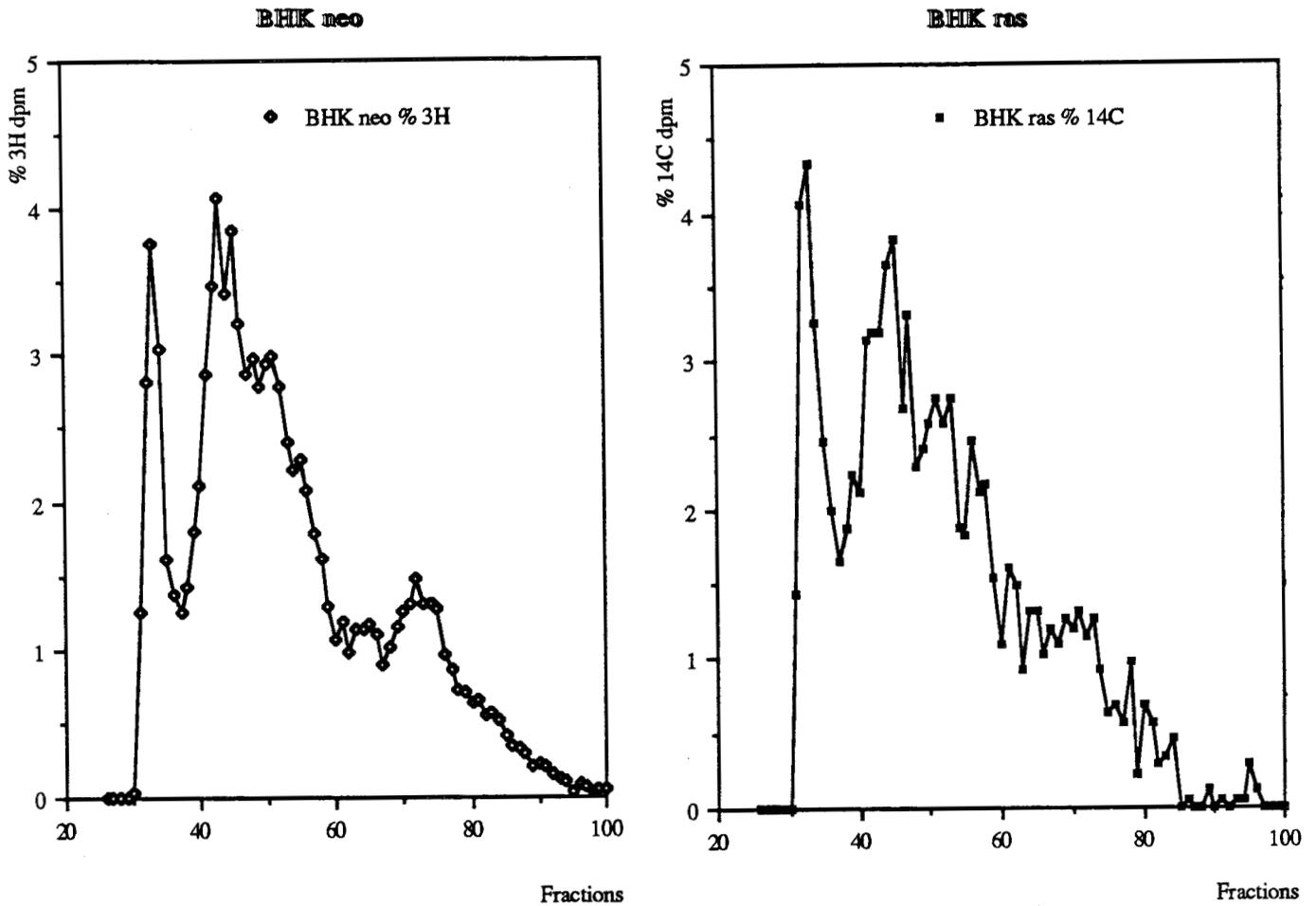
- 5 litres de culture sur Cytodex, 9 bouteilles "rollers" (dont 6 réutilisés une fois) et 6 flacons radio-marqués au tritium de cellules NIH.

La masse brute des culots de (glyco)protéines délipidées avant l'hydrolyse pronasique ou alcaline a varié de 11 g (cellules BHK/HSV) à 5 g (cellules NIH). Celle des fractions obtenues est de l'ordre de 20 à 500 µg, atteignant souvent la limite inférieure de détection en spectroscopie de RMN (voir la discussion générale ci-dessous).

1. Fractionnement des glycopeptides de cellules BHK/HSV

L'hydrolysate pronasique a été fractionné sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (figure 30). Les fractions 33 à 72 de ce fractionnement (N-glycosylpeptides) ont été sous-fractionnées sur les deux colonnes de lectines immobilisées décrites dans le Chapitre II (figure 31).

Lors du dessalage de ces différentes fractions, effectué sur colonne de Trisacryl GF-05 M, nous avons obtenu un sous-fractionnement supplémentaire, les fractions apparaissant dédoublées (deux exemples caractéristiques sont fournis dans les figures 32A et 32B). L'analyse structurale de ces populations a montré que le second pic d'éluion contient les mêmes structures que le pic majeur à la différence près qu'elles sont partiellement désialylées (voir ci-dessous).



BHK neo - BHK ras Cofractionnement Aca

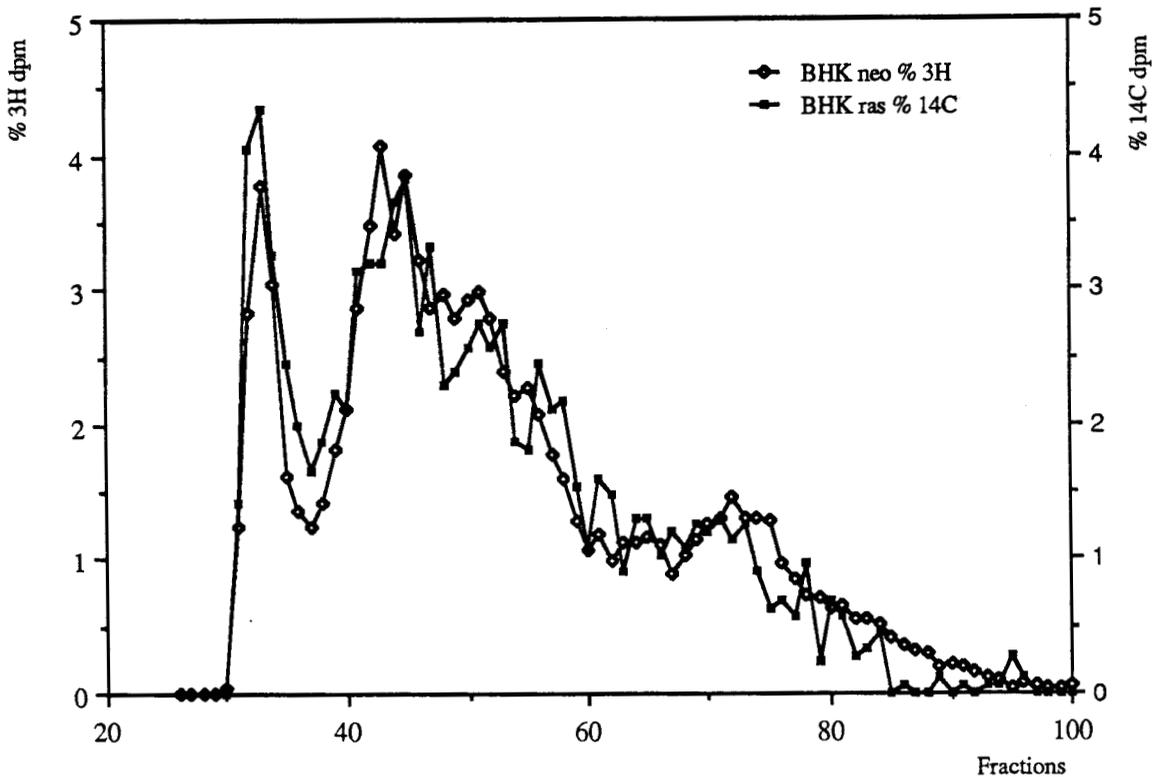


Figure 26 : Co-chromatographie analytique de gel-filtration des glycopeptides pronasiques totaux de cellules BHK $_{neo}$ et BHK $_{ras}$ sur colonne d'Ultrogel AcA 202. Noter les différences du profil d'éluion. Les conditions opératoires sont précisées dans le Chapitre II.

BHK neo - BHK ras Cofractionnement ConA

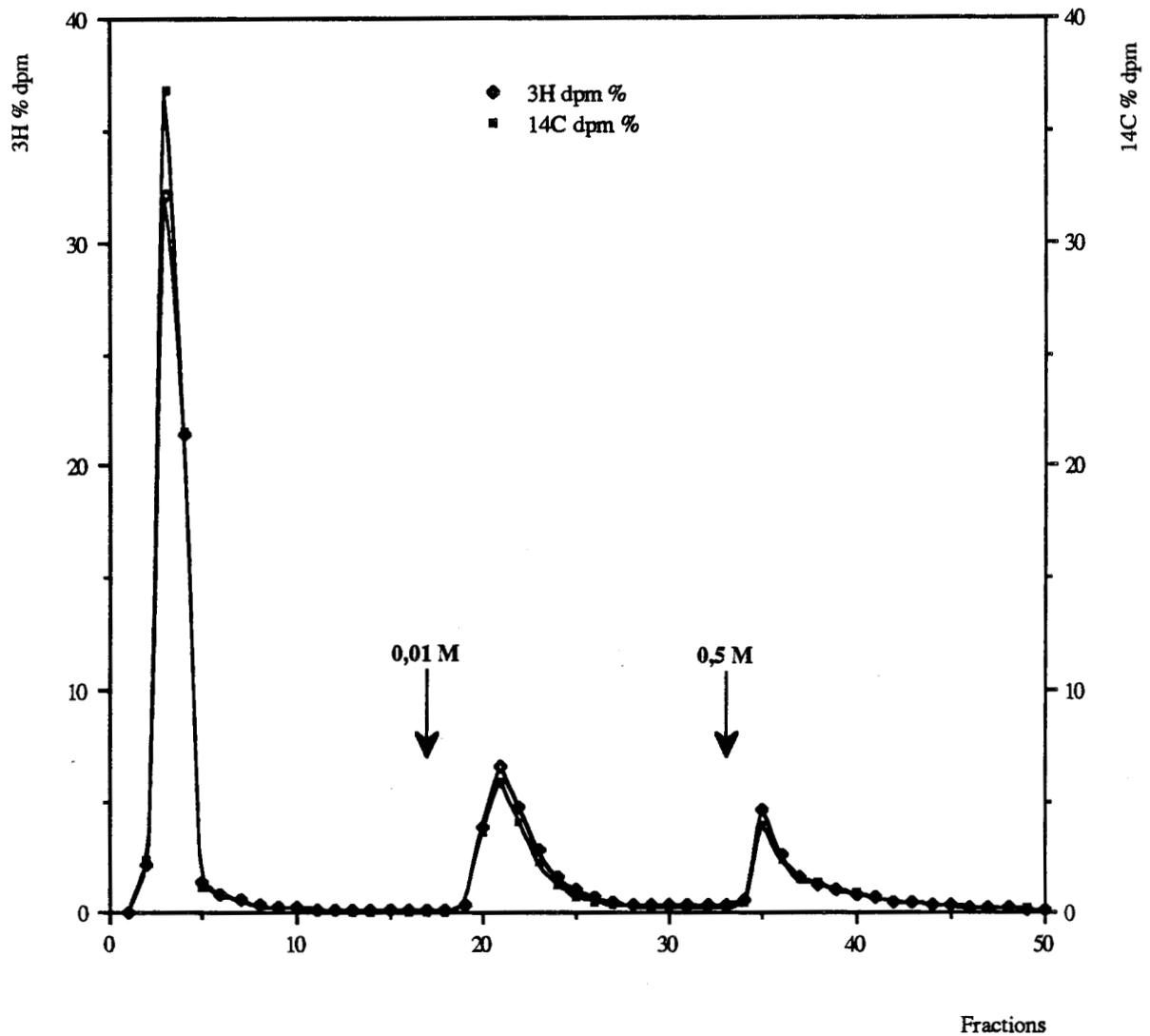


Figure 27 : Co-chromatographie d'affinité des N-glycosylpeptides de cellules BHK*neo* et BHK*ras*, provenant du fractionnement par gel-filtration, sur colonne de ConA immobilisée. Les conditions opératoires sont précisées dans le Chapitre II. La molarité du glucoside utilisé pour l'éluion est indiquée par les flèches.

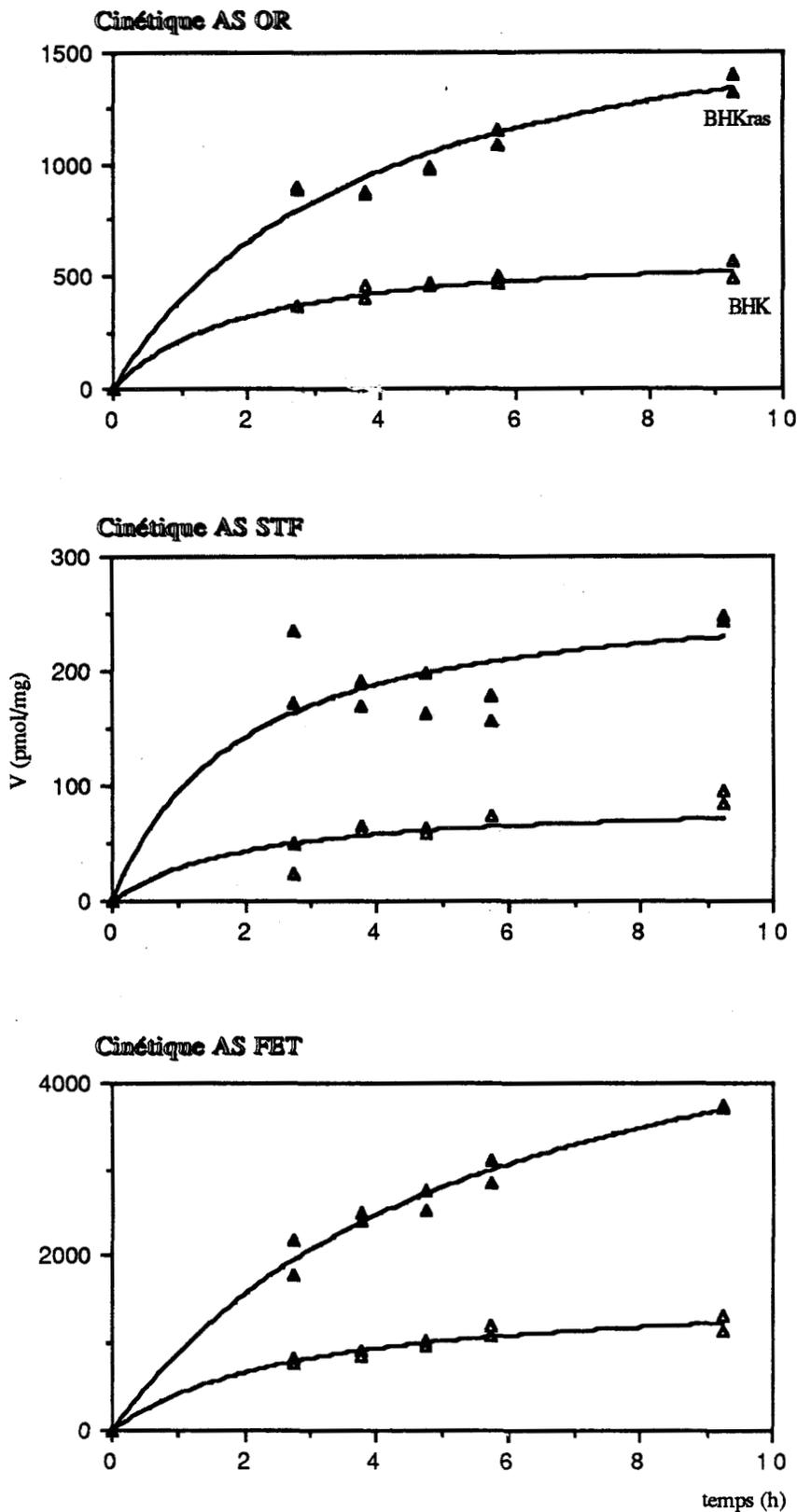


Figure 28 : Cinétiques enzymatiques de transfert d'acide N-acétylneuraminique radio-marqué sur trois accepteurs désialylés. AS OR : asialo-orosomucoïde ; AS STF: asialo-sérotransferrine ; AS FET : asialo-fétuine. La vitesse de réaction sont exprimée en pmol de NeuAc transféré par mg de protéine dans l'homogénat cellulaire étudié. Le mode opératoire pour ces dosages est décrit dans le paragraphe "Materials and Methods" du mémoire soumis à publication (p. 85). Le transfert est multiplié par 2,5 en moyenne dans les cellules transfectées.

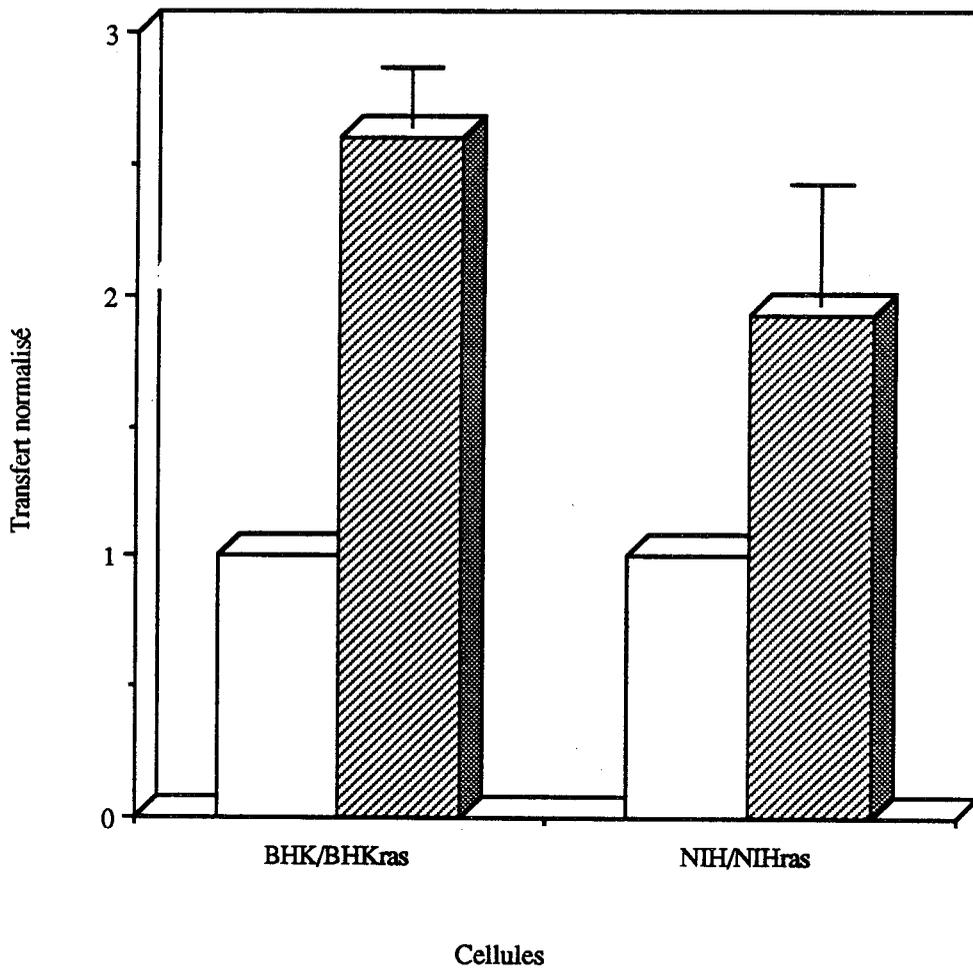


Figure 29 : Comparaison de l'effet de l'oncogène *ras* sur l'activité sialyltransférase des cellules transfectées. Les valeurs sont normalisées à partir des résultats obtenus sur l'asialo-orosomucoïde avec les homogénats cellulaires de référence (BHK 21 ou NIH 3T3 = 1). La présence de l'oncogène s'avère responsable de l'augmentation de l'activité enzymatique étudiée dans les deux systèmes cellulaires.

2. Fractionnement des glycopeptides de cellules BHK

L'hydrolysate pronasique a été fractionné en deux populations sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (figure 33), ce qui est particulièrement atypique pour ce genre de fractionnement. Nous n'avons pas pu obtenir un quelconque fractionnement du pic majeur sur colonne de ConA immobilisée (figure 34). Nous avons, dans un premier temps incriminé le gel, mais cette supposition s'est avérée fautive, puisque deux passages successifs de la fraction sur une colonne montée à partir de gel neuf ne nous ont pas permis d'obtenir un fractionnement. En dernier recours, nous avons procédé à l'hydrolyse alcaline de cette fraction dans des conditions réductrices, ce qui a libéré une partie du matériel, consistant probablement à des glycanes liés à la Ser (ou Thr) (figure 35).

3. Fractionnement des glycopeptides de cellules BHK_{ras}

L'hydrolysate pronasique a été fractionné sur la colonne de Trisacryl GF-05 M (figure 36). Les fractions 33 à 50 de cette étape ont été sous-fractionnées sur les lectines immobilisées (figure 37) et les fractions résultantes également sous-fractionnées lors du dessalage subséquent.

4. Fractionnement des glycopeptides de cellules NIH

Ces glycopeptides ont été préparés par hydrolyse alcaline (figure 38) et fractionnés sur les lectines immobilisées dans les conditions déjà décrites (figure 39). Le sous-fractionnement de populations désialylées mentionné plus haut, a été observé lors du dessalage des fractions sur la colonne de Trisacryl GF-05 M.

5. Fractionnement des glycopeptides de cellules NIH_{ras-m}

Ces glycopeptides ont été préparés dans les mêmes conditions que les glycopeptides de cellules NIH, et fractionnés par gel-filtration (figure 40) puis par chromatographie d'affinité sur les lectines immobilisées (figure 41).

F. ANALYSES STRUCTURALES DES GLYCANNES ET GLYCOPEPTIDES

Toutes les fractions non-retenues sur les lectines employées ont été hydrazinolysées, N-ré-acétylées et réduites, puis fractionnées par HPLC d'échange d'ions sur la colonne Micropak AX-10 décrite. Les pics majeurs obtenus ont été lyophilisés, dessalés sur une colonne de Fractogel TSK et analysés par spectroscopie de RMN.

Les fractions qui n'ont pas subi l'hydrazinolyse (FEC 0,01 M FNRL et FEL, contenant des glycopeptides porteurs de glycanes bi-antennés) ont été dessalées et analysées par spectroscopie de RMN.

Ces analyses ne sont pas terminées à l'heure actuelle ; nous avons identifié jusqu'ici des structures déjà décrites dans la littérature en ce qui concerne les glycannes N-acétyllactosaminiques bi- et tri-antennés, avec des différences mineures de la sialylation et de la fucosylation. De nombreuses fractions hydrazinolysées ont présenté un comportement anormal lors du fractionnement par HPLC et lors de l'analyse spectroscopique par RMN, ce qui indique que cette méthode, mise au point sur des glycannes de glycoprotéines solubles, est particulièrement destructrice sur les glycopeptides membranaires. Nous envisageons l'emploi d'autres techniques comme la méthylation suivie de l'analyse par spectrométrie de masse, afin d'obtenir davantage de renseignements structuraux.

Fractionnement de l'hydrolysat pronasique sur Ultrogel AcA 202

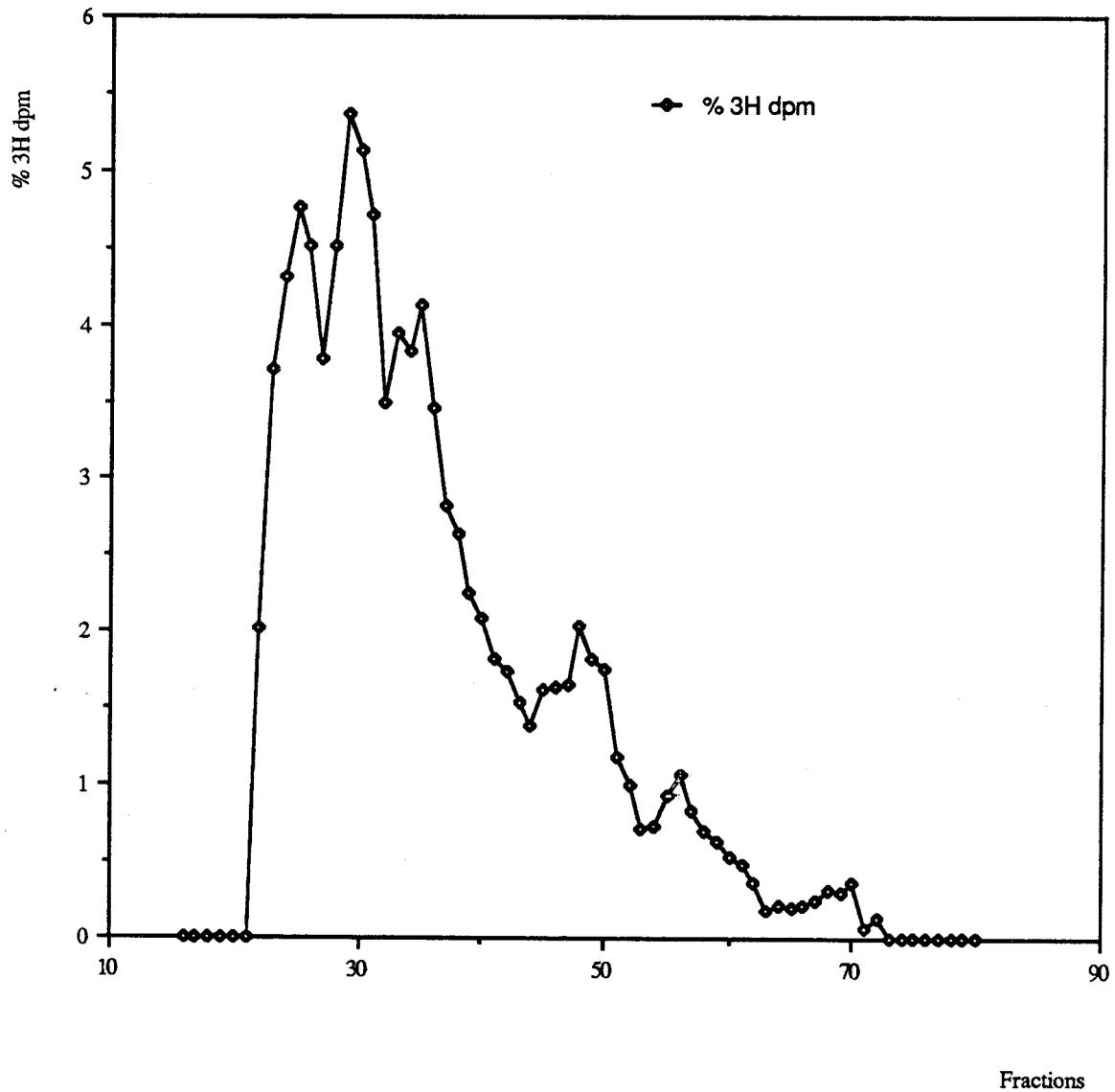
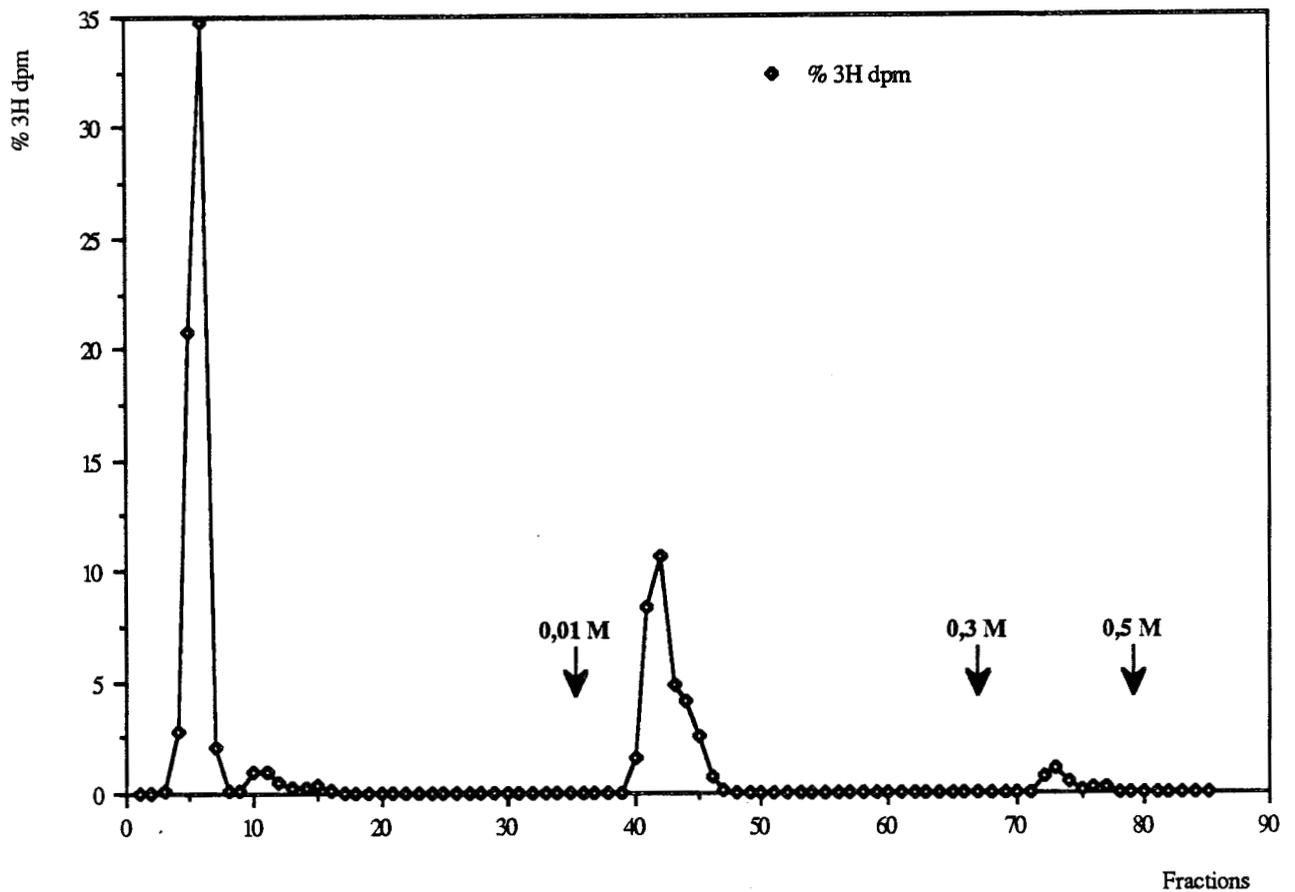
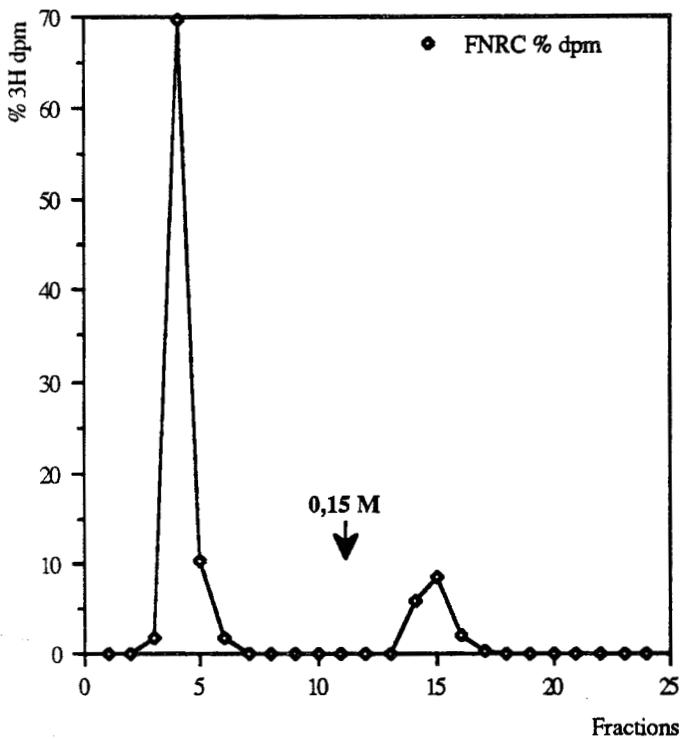


Figure 30 : Chromatographie de gel-filtration préparative des glycopeptides pronasiques de cellules BHK/HSV sur colonne d'Ultrogel AcA 202. Se reporter au texte pour le mode opératoire.

Fractionnement ConA



Fractionnement LCA de la FNRC



Fractionnement LCA de la FEC 0,01 M

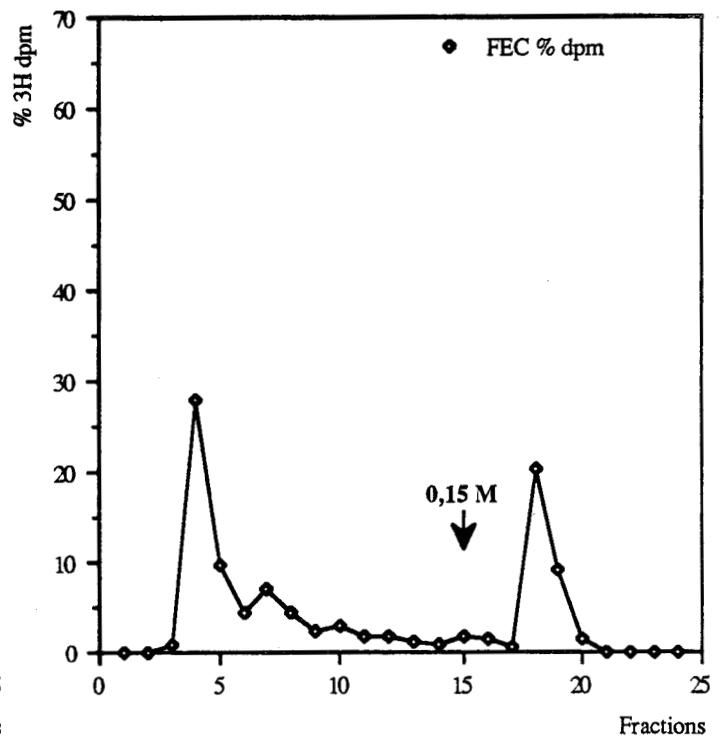
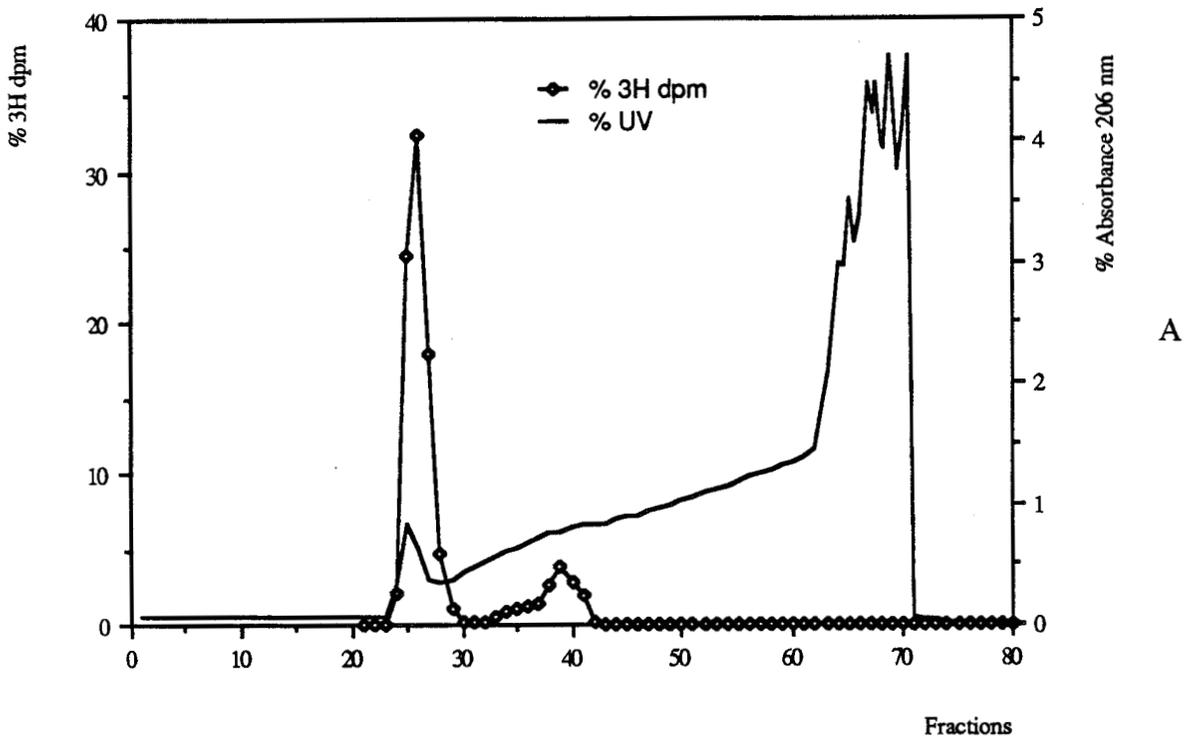


Figure 31 : Chromatographie d'affinité préparative des N-glycosylpeptides de cellules BHK/HSV provenant du fractionnement ci-contre (figure 30) sur des colonnes de ConA et de LCA immobilisées. Les détails du mode opératoire sont fournis dans le texte. La molarité de l'agent d'éluion utilisé est indiquée par les flèches.

FEC 0,01 M - FNRL / GF-05



FEC 0,01 M FEL / GF-05

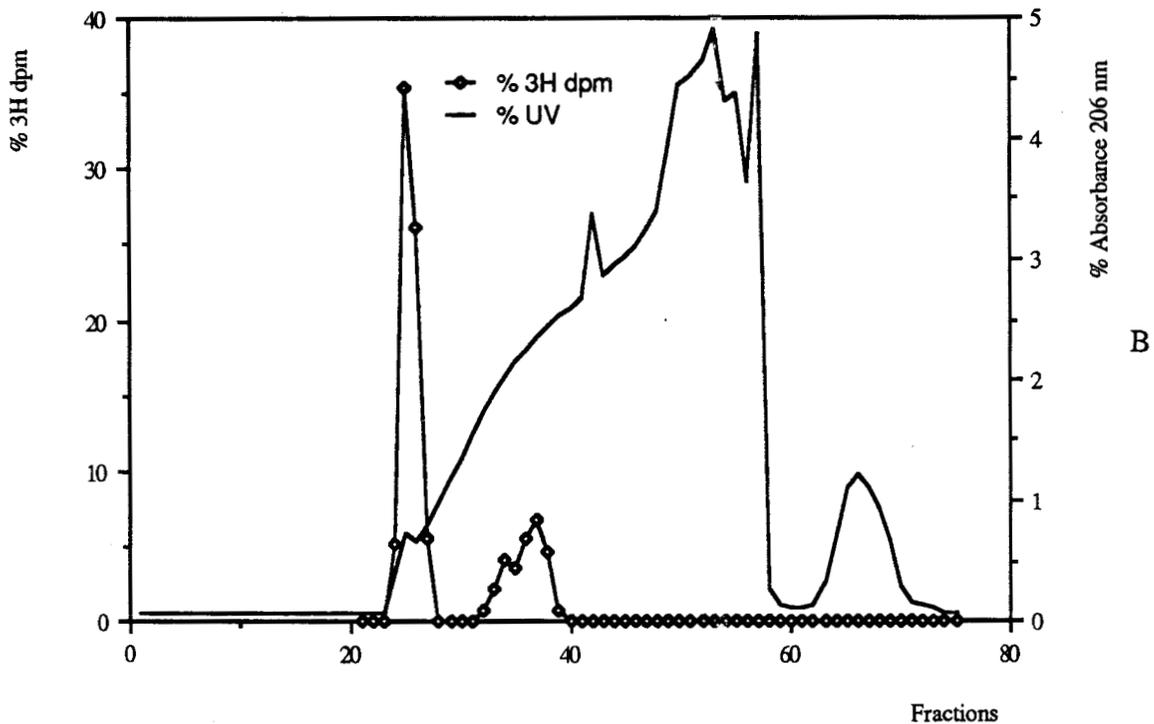


Figure 32 : Sous-fractionnement obtenu lors du dessalage des fractions précédentes sur colonne de Trisacryl GF-05. Le pic mineur contient des glycopeptides partiellement désialylés. A : fraction FEC 0,01 M-FNRL ; B : fraction FEC 0,01 M-FEL.

Fractionnement de l'hydrolysât pronasique sur Ultrogel AcA 202

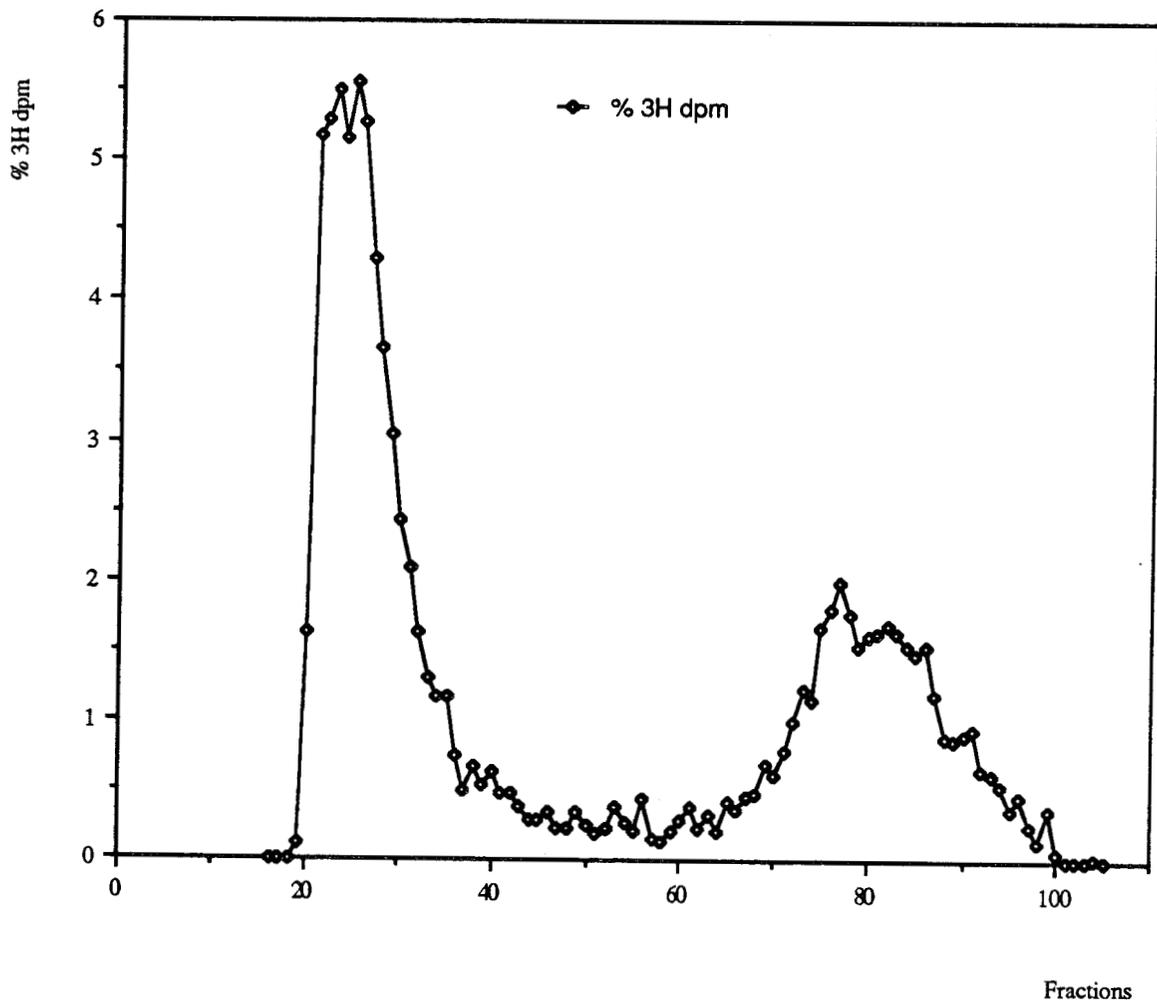


Figure 33 : Chromatographie de gel-filtration préparative des glycopeptides pronasiques de cellules BHK sur colonne d'Ultrogel AcA 202. Se reporter au texte pour le mode opératoire.

Fractionnement ConA

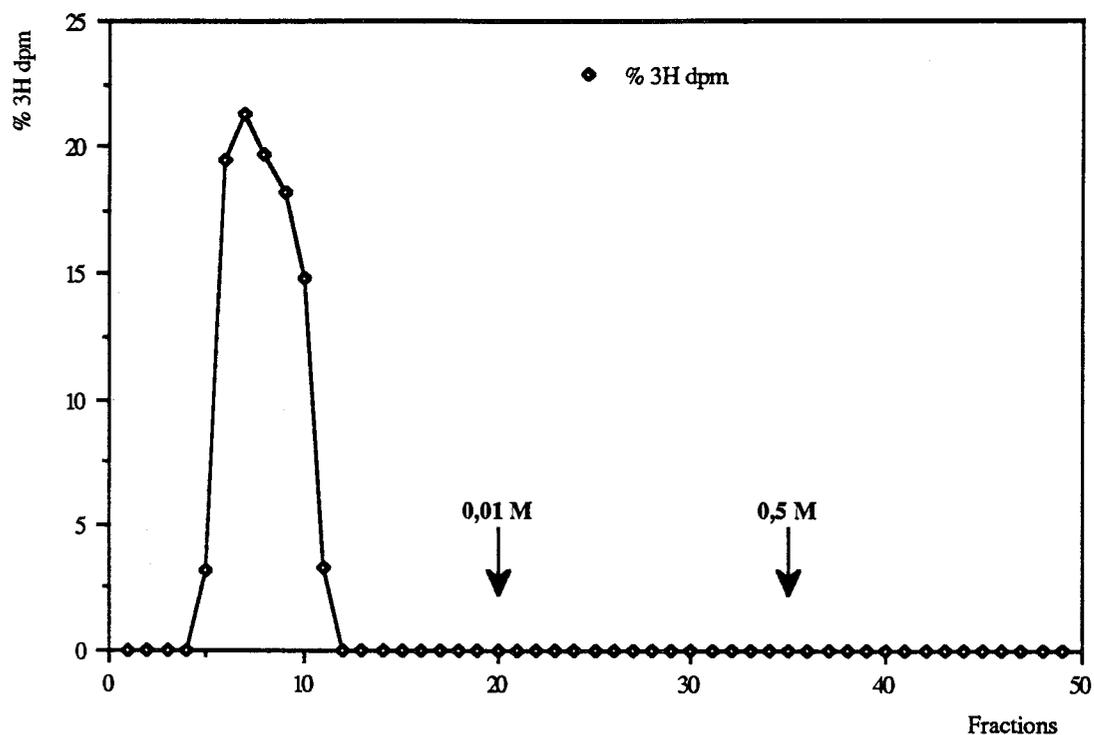


Figure 34 : Absence de fractionnement du pic majeur provenant du fractionnement ci-contre sur colonne de ConA immobilisée.

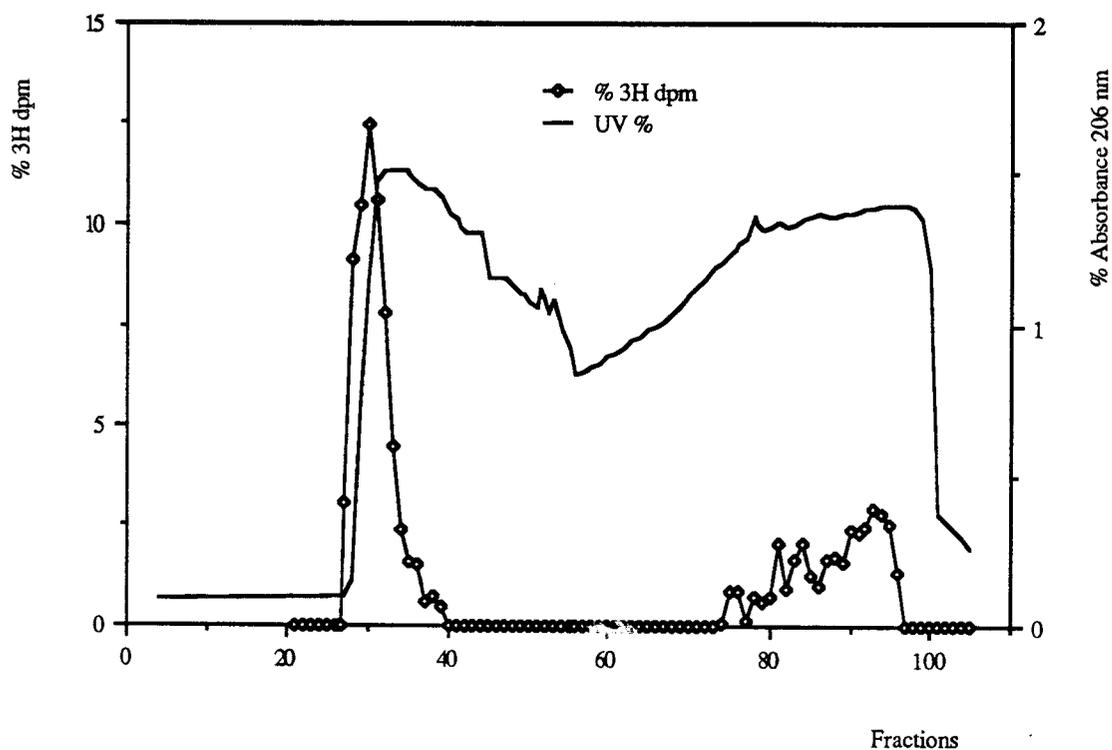
Fractionnement GF-05 après β -élimination

Figure 35 : Fractionnement obtenu sur colonne de Trisacryl GF-05 après hydrolyse alcaline ménagée dans des conditions réductrices du pic unique, non-retenu sur la lectine (figure 34).

Fractionnement de l'hydrolysate pronasique sur Trisacryl GF-05

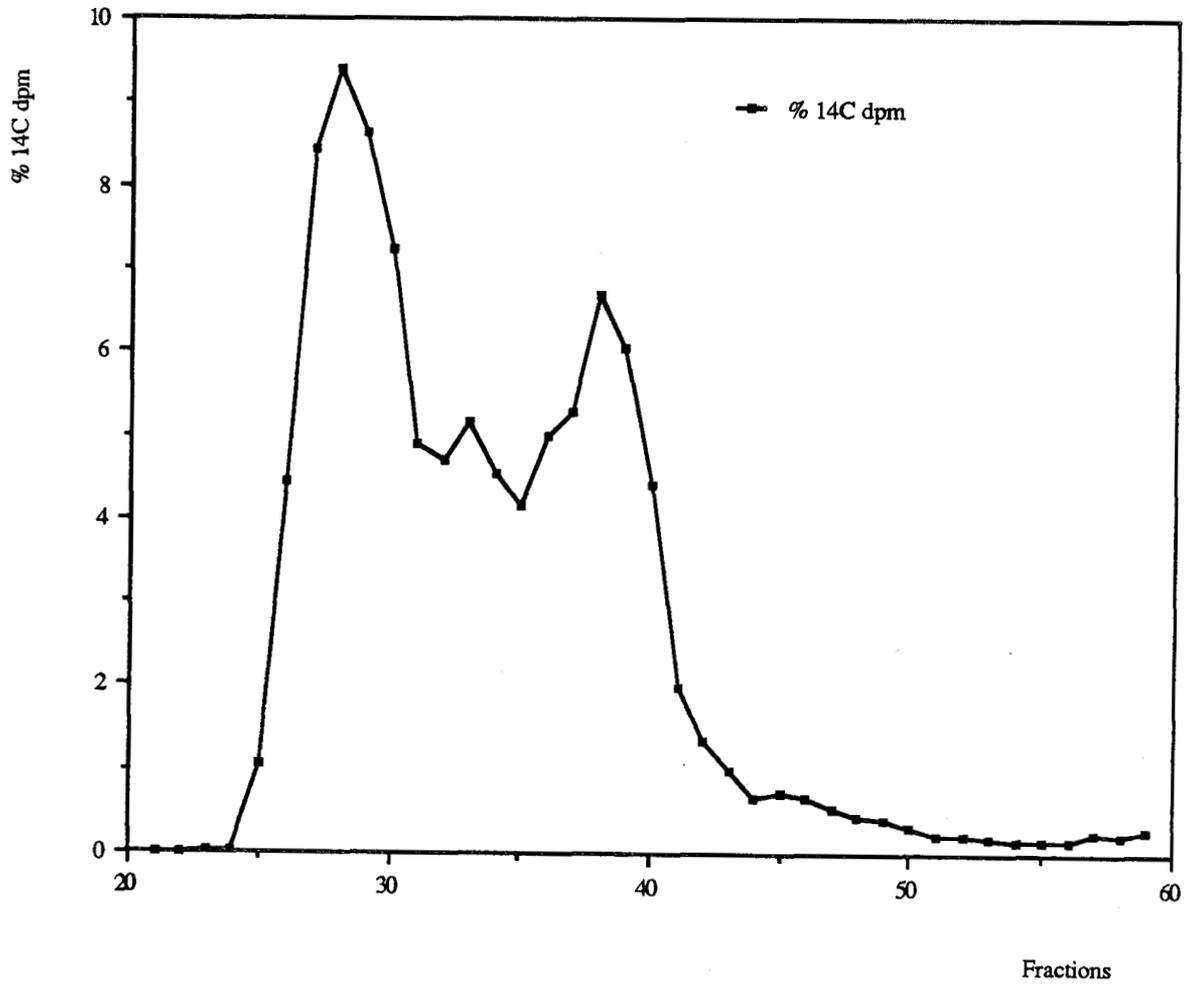
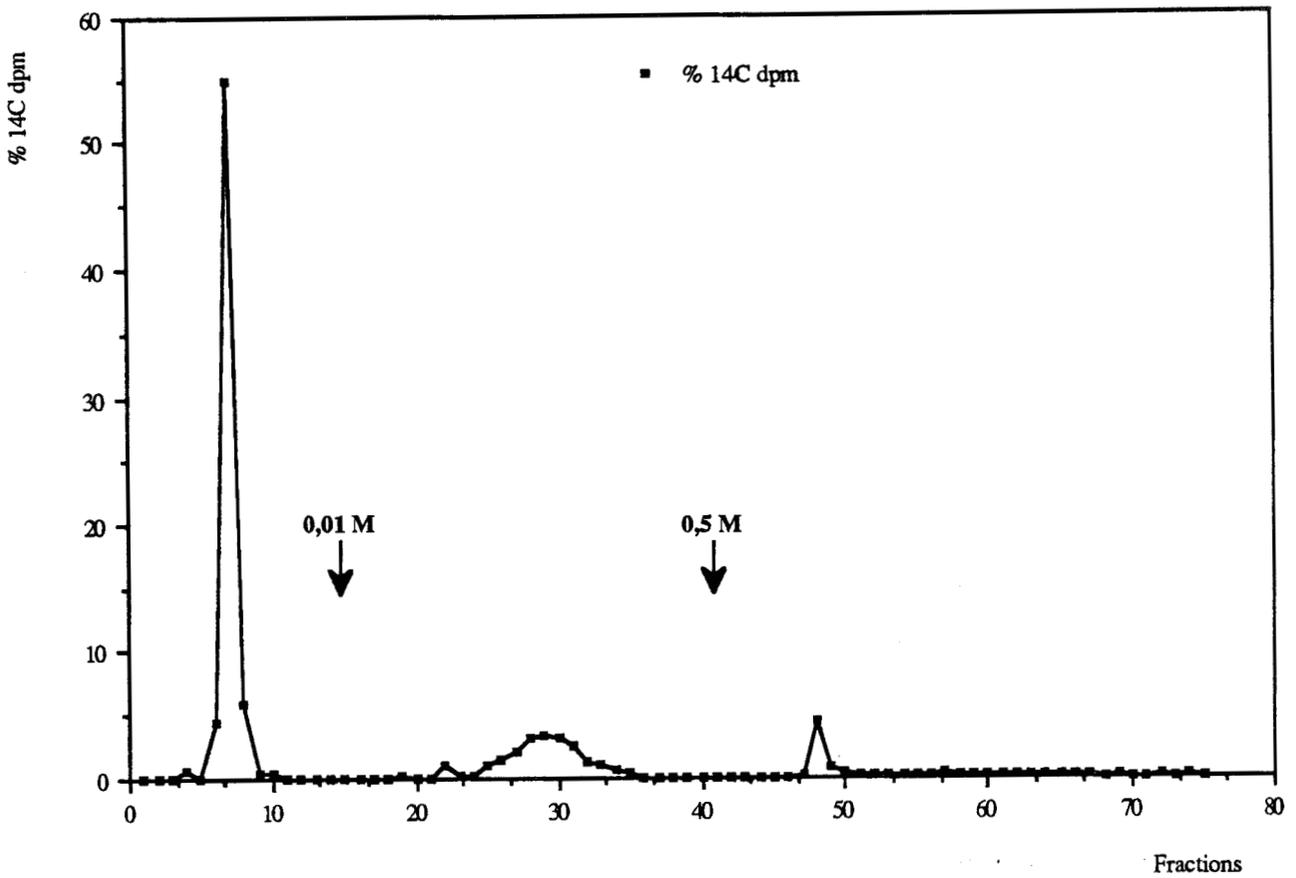
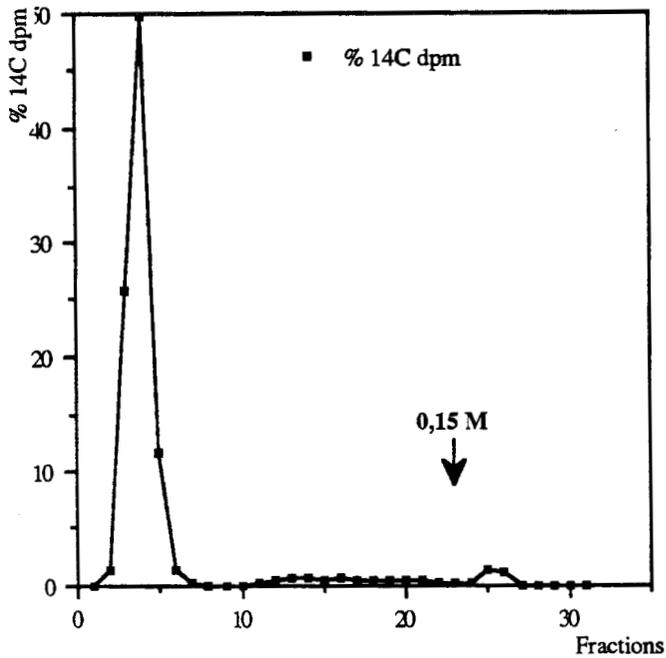


Figure 36 : Chromatographie de gel-filtration préparative des glycopeptides pronasiques de cellules BHKras sur colonne de Trisacryl GF-05. Se reporter au texte pour le mode opératoire.

Fractionnement ConA



Fractionnement LCA de la FNRC



Fractionnement LCA de la FEC 0,01 M

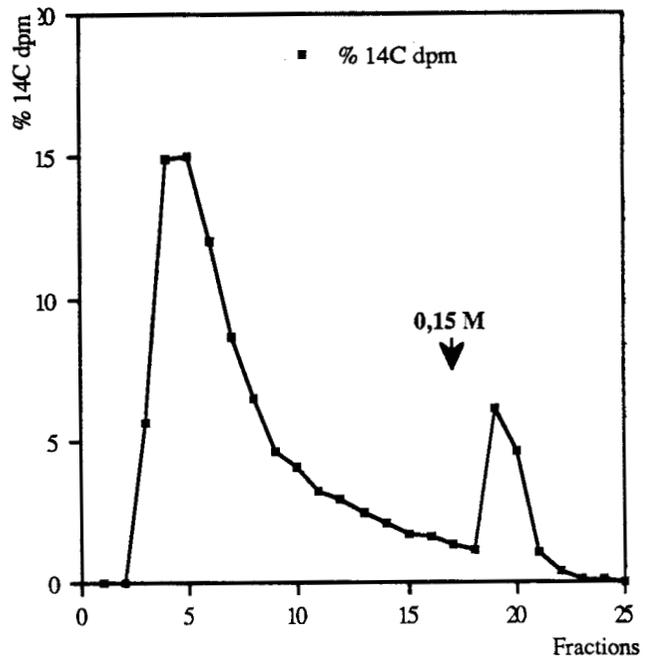


Figure 37 : Chromatographie d'affinité préparative des N-glycosylpeptides de cellules BHK ras provenant du fractionnement ci-contre (figure 36) sur des colonnes de ConA et de LCA immobilisées. Les détails du mode opératoire sont fournis dans le texte. La molarité de l'agent d'éluion utilisé est indiquée par les flèches.

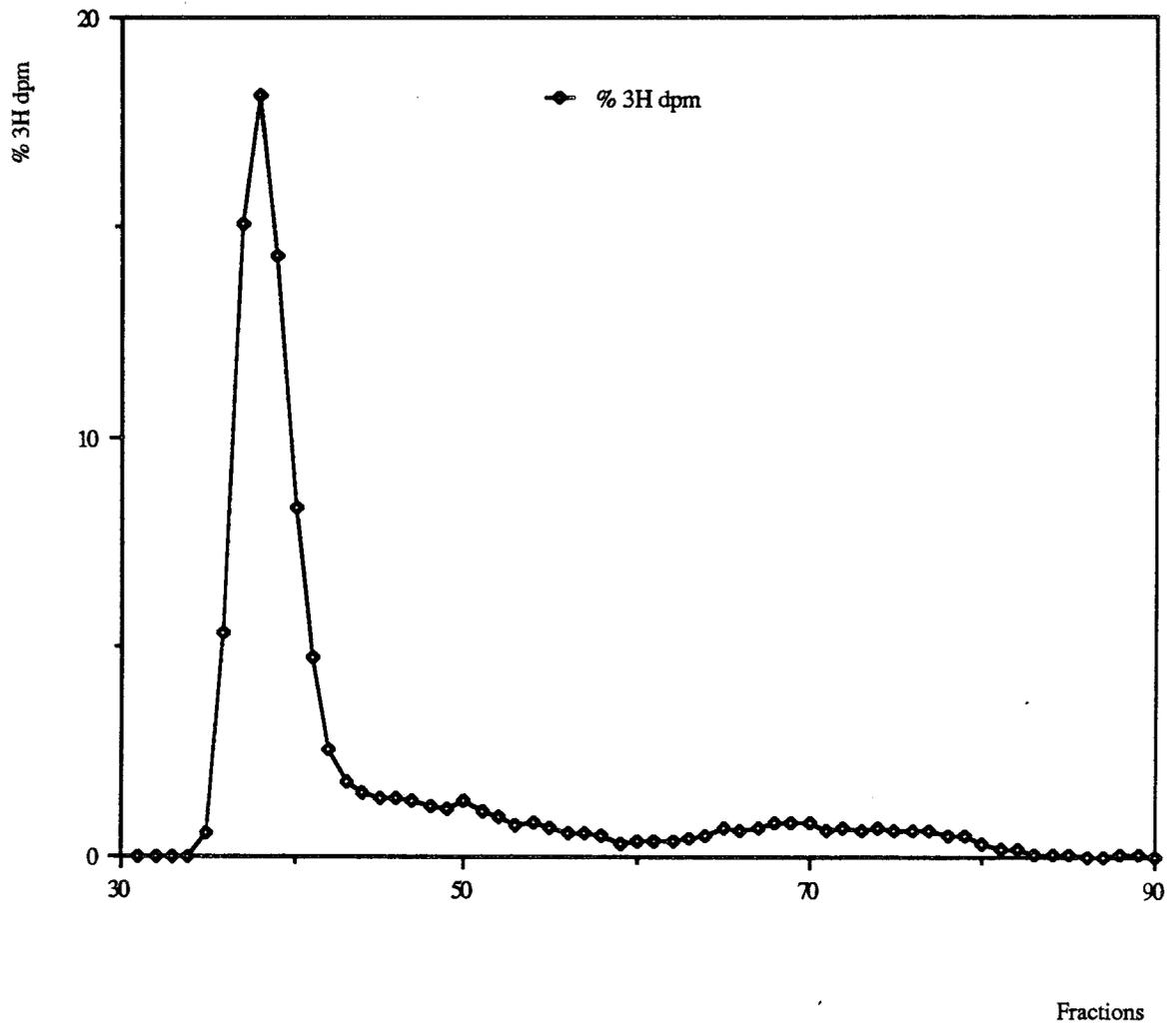
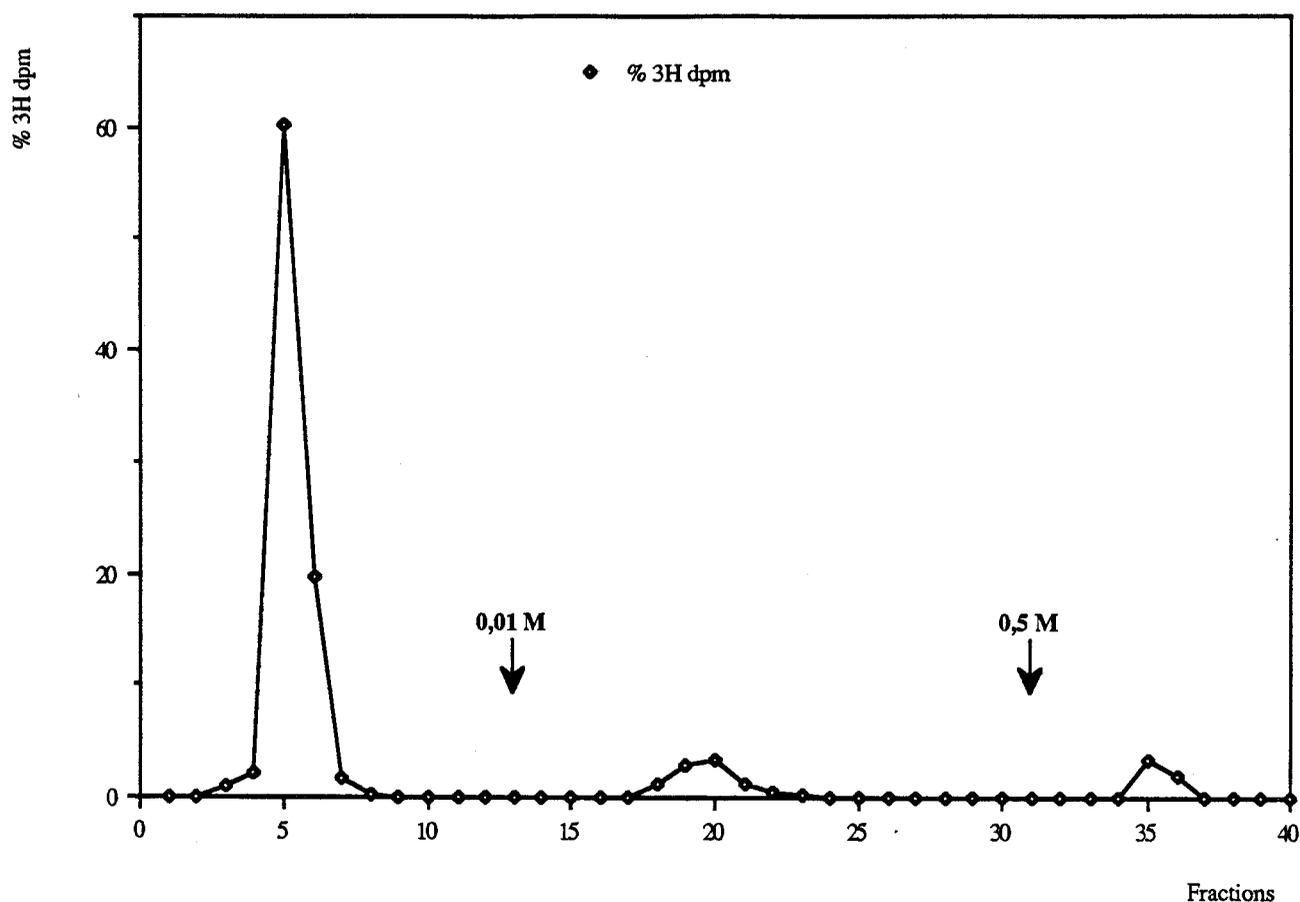
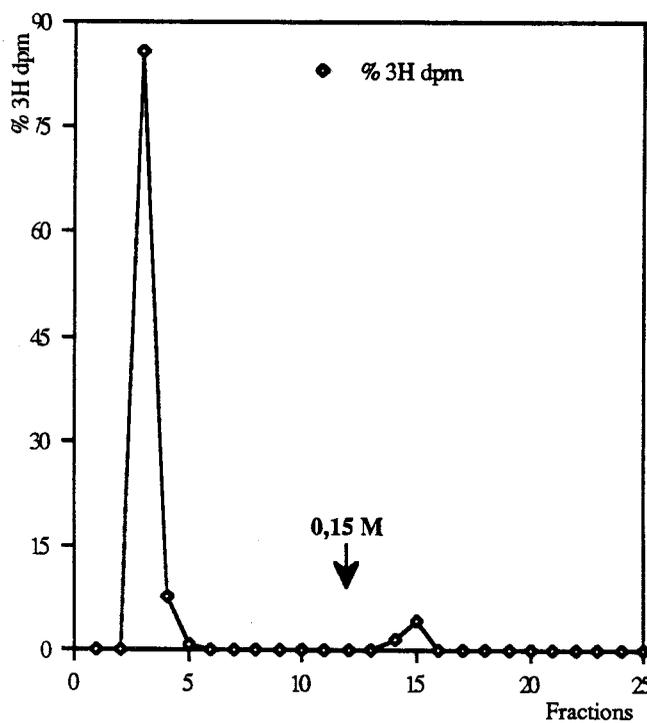
Fractionnement sur Trisacryl GF-05 après β -Elimination

Figure 38 : Chromatographie de gel-filtration préparative sur colonne de Trisacryl GF-05 de l'hydrolysate alcalin des glycoprotéines délipidées de cellules NIH 3T3. Le mode opératoire est précisé dans le texte (chapitre II).

Fractionnement ConA



Fractionnement LCA de la FNRC



Fractionnement LCA de la FEC 0,01 M

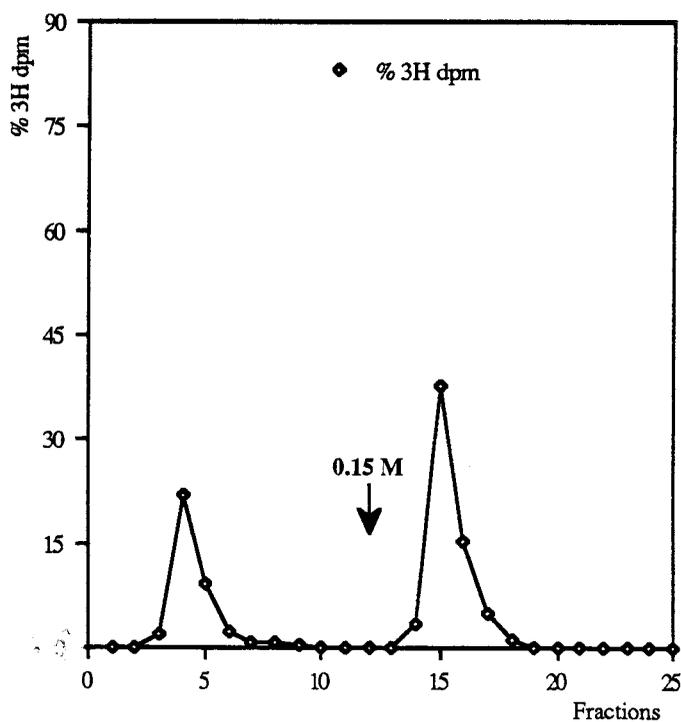


Figure 39 : Chromatographie d'affinité préparative des N-glycosylpeptides de cellules NIH 3T3 provenant du fractionnement ci-contre (figure 38) sur des colonnes de ConA et de LCA immobilisées. Les détails du mode opératoire sont fournis dans le texte. La molarité de l'agent d'éluion utilisé est indiquée par les flèches.

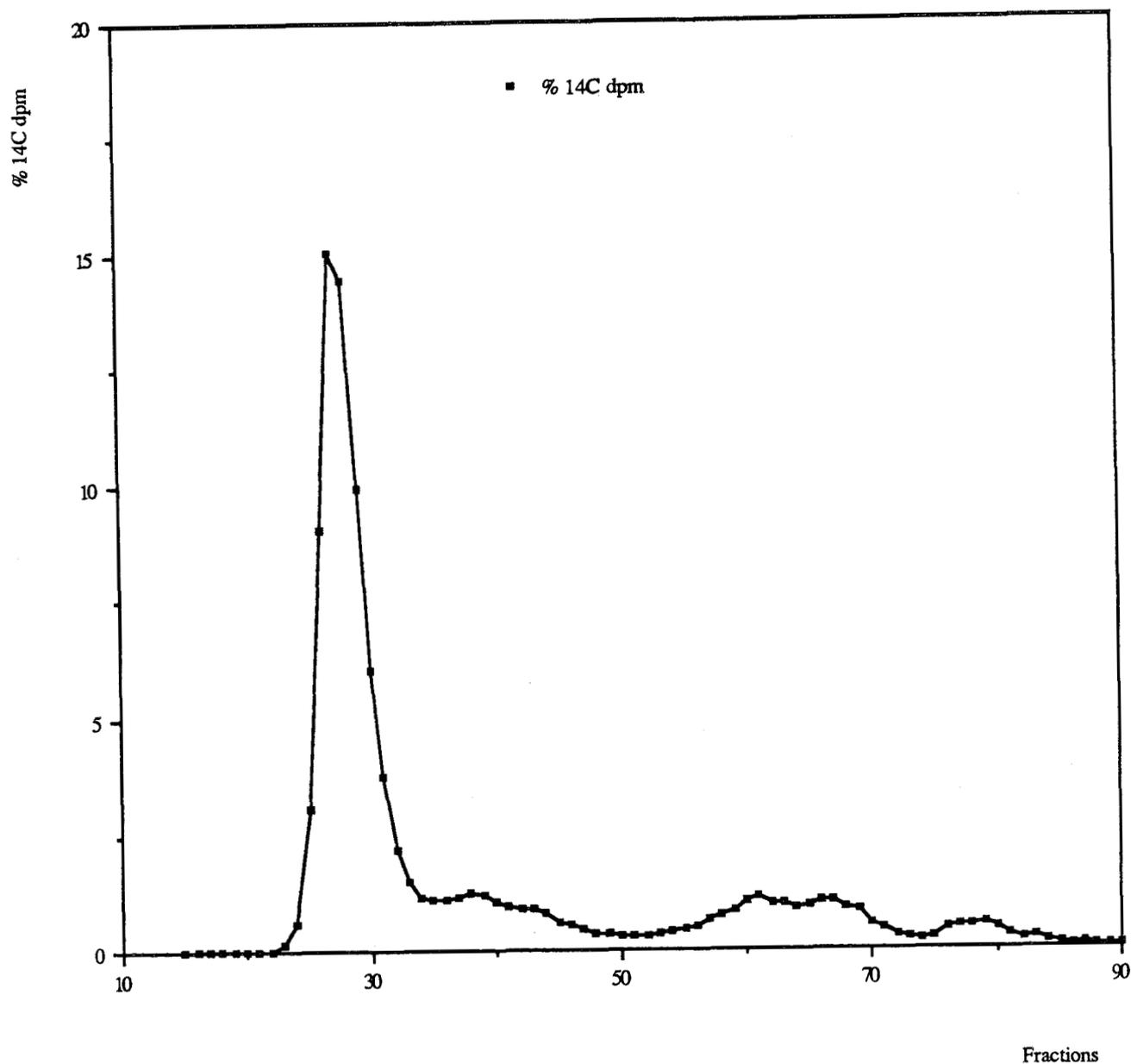
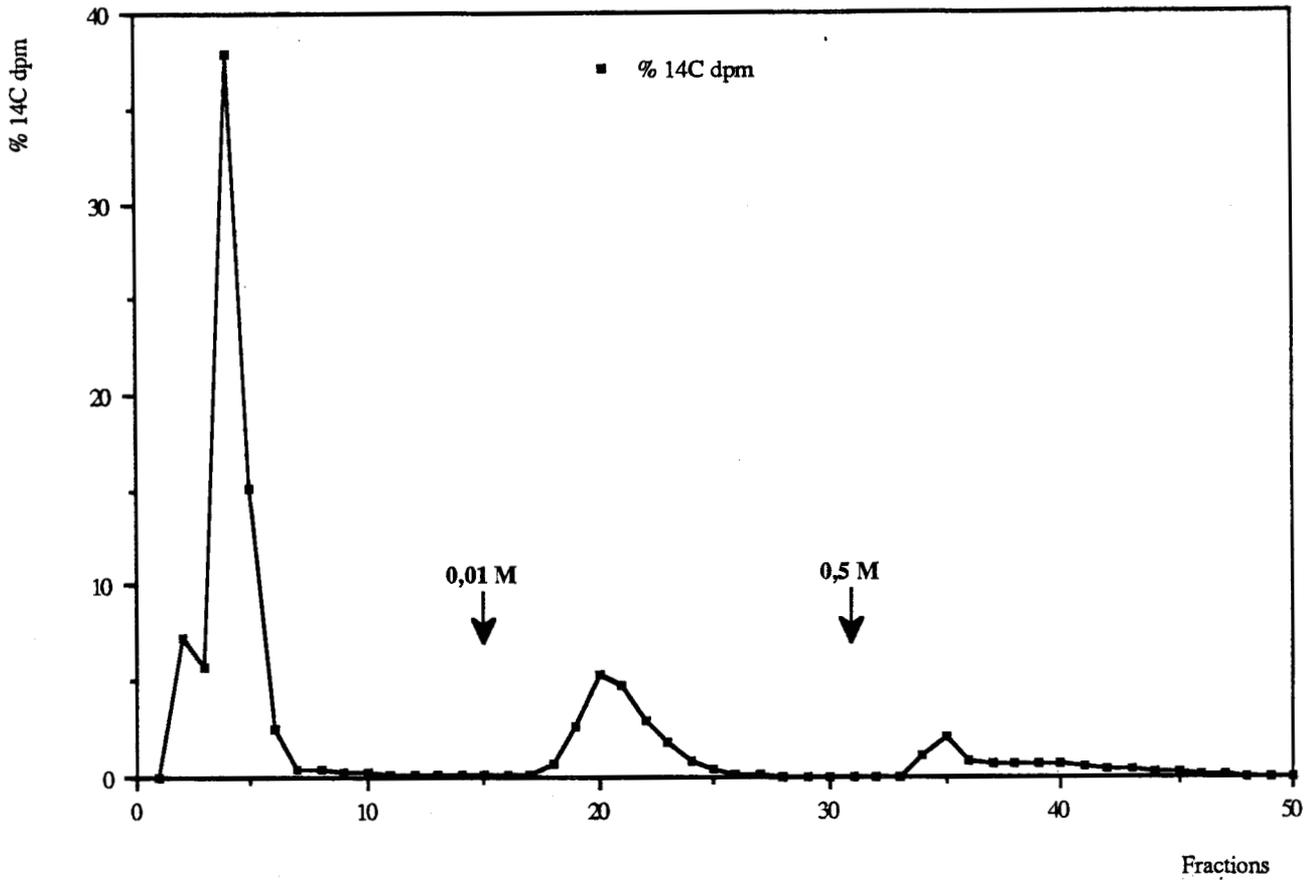
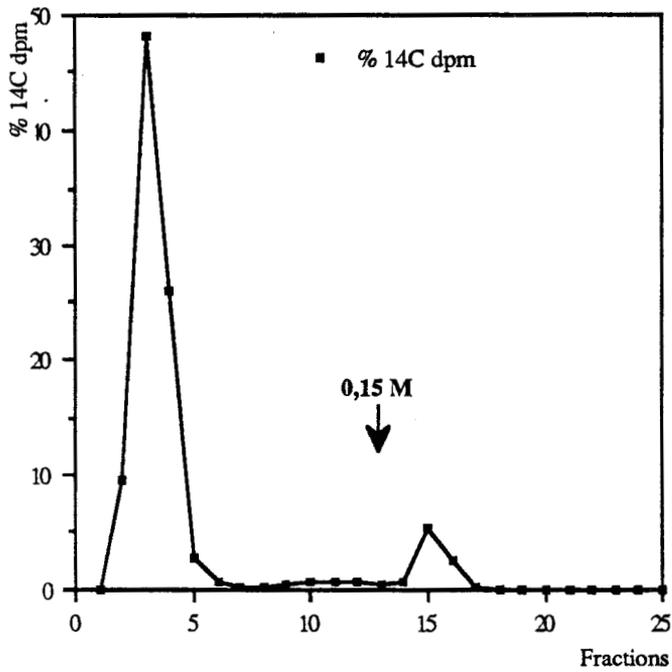
Fractionnement sur Trisacryl GF-05 après β -élimination

Figure 40 : Chromatographie de gel-filtration préparative sur colonne de Trisacryl GF-05 de l'hydrolysât alcalin des glycoprotéines délipidées de cellules NIHras. Le mode opératoire est précisé dans le texte (chapitre II).

Fractionnement ConA



Fractionnement LCA de la FNRC



Fractionnement LCA de la FEC 0,01 M

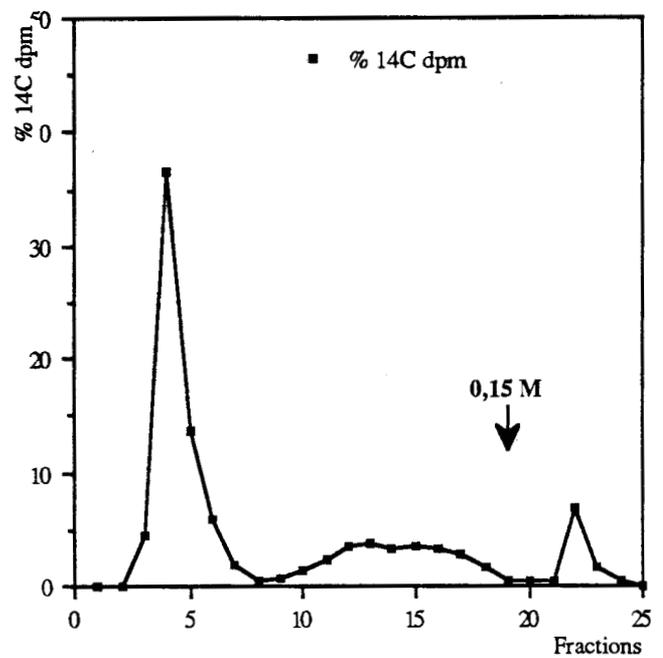


Figure 41 : Chromatographie d'affinité préparative des N-glycosylpeptides de cellules NIHras provenant du fractionnement ci-contre (figure 40) sur des colonnes de ConA et de LCA immobilisées. Les détails du mode opératoire sont fournis dans le texte. La molarité de l'agent d'éluion utilisé est indiquée par les flèches.

DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

* Transfection

Nous avons choisi d'introduire l'oncogène par la technique de Graham & Van der Eb (voir les chapitres II et III), en vérifiant l'inocuité de la méthode sur le comportement *in vivo* des cellules transfectées. Les résultats obtenus discordent entre nos deux systèmes cellulaires, mais aussi avec la littérature en ce qui concerne les cellules NIH 3T3 (étude de Kerbel *et al.* déjà citée). Ceci permet de supposer que le nombre de cellules témoins injectées ou le temps d'observation (ou les deux) furent insuffisants pour induire l'apparition de tumeurs. Néanmoins, dans le modèle NIH 3T3/NIH*ras*, les poumons des animaux ayant reçu les cellules NIH*neo* n'ont pas fourni de cellules résistantes à l'antibiotique. Ceci indique que dans notre système expérimental seules les cellules NIH*ras* peuvent être considérées capables de métastaser et que la transfection par la technique utilisée n'est pas à mettre en cause. Cette suggestion est en outre confirmée par le fait que l'activité sialyltransférase de l'homogénat de cellules NIH*neo* est pratiquement identique à celle de l'homogénat de cellules NIH 3T3, l'augmentation de cette activité étant corrélée à la malignité.

D'autres méthodes ont été mises au point pour introduire des gènes transformants dans les cellules en culture. Afin de lever l'ambiguïté sur ce point, il serait utile de reprendre les expériences *in vivo* avec des cellules ayant été transformées par d'autres techniques et de détecter d'éventuelles variations de la modification des activités glycosyltransférases.

* Analyses structurales

Nous nous sommes heurté à des difficultés de purification des glycopeptides membranaires. Nous avons pensé avoir résolu ce problème lors d'études antérieures (Cazlaris, 1986), en purifiant les glycopeptides par passage sur une colonne de Fractogel TSK et en préparant des quantités importantes. Le peu de renseignements structuraux obtenus soulève à nouveau ces problèmes, et impose les remarques suivantes :

- Les quantités de matériel cellulaire nécessaires au départ sont considérables. La culture sur les microporteurs Cytodex nous permet, certes, de préparer, en une seule opération et en un temps relativement court, environ 10^{10} cellules, ce qui semble être un minimum nécessaire pour des analyses structurales complètes, au vu du très faible rendement global. D'autre part, quelle que soit la technique utilisée pour la préparation des glycopeptides, le problème de la purification finale avant l'analyse par spectroscopie de RMN est résolu par l'emploi du Fractogel. En revanche, les deux modes utilisés (hydrolyse alcaline dans des conditions réductrices ou hydrolyse pronasique) comportent des inconvénients, puisque une désialylation partielle des glycanes est observée au cours du fractionnement, et que l'hydrolyse chimique libère très probablement les groupements phosphate ou sulfate portés par les glycanes. L'hydrazinolyse s'avère également particulièrement destructrice, puisque nous avons obtenu un fractionnement souvent douteux à l'étape d'HPLC qui

lui fait suite. Il est donc clair que les glycoprotéines membranaires ne se comportent pas comme leurs homologues solubles, probablement de par leur structure particulière, comportant des régions hydrophobes qui permettent l'ancrage dans les membranes. Ces régions pourraient créer un environnement inaccessible pour la pronase, ce qui expliquerait la difficulté, voire l'impossibilité d'obtenir des glyco-asparagines (en effet, les résultats de RMN montrent la présence de résidus d'asparagine liés à d'autres amino-acides). L'hydrolyse alcaline présente, à ce titre, un double avantage : d'une part, l'accessibilité des glycannes au réactif est plus grande ; d'autre part, la méthode est beaucoup moins onéreuse. Ceci ne résout pas la question de la qualité des produits obtenus, puisque nous avons observé la désialylation partielle lors du dessalage après la chromatographie d'affinité.

- D'autres méthodes de libération des glycannes seraient envisageables, notamment l'hydrolyse alcaline drastique (Lee & Scocca, 1972) qui présente toutefois l'inconvénient de dégrader les glycannes liés O-glycosidiquement. De plus, cette méthode ne permet pas de fractionner les oligosaccharides sur certaines lectines immobilisées nécessitant la présence du peptide. L'emploi de cette méthode n'a pas fourni de résultats satisfaisants, dans la mesure où nous avons observé des pertes variant de 15 à 30 % en radio-activité lors d'une étude menée sur des quantités analytiques (résultats non présentés). Les coupures par des endoglycosidases présentent, quant à elles, l'inconvénient de ne pas être totalement contrôlables, la plupart des enzymes du marché étant contaminés par des activités exoglycosidasiques. Nous avons tenté d'utiliser la N-Glycanase dans une étude menée sur des quantités analytiques (résultats non présentés), et nous n'avons pu atteindre que 60 à 70 % de rendement de coupure à partir de glycopeptides membranaires obtenus par action ménagée de la pronase. Le coût de cet enzyme étant par ailleurs prohibitif, nous pensons que son utilisation n'est pas envisageable à l'échelle préparative.

- Une autre remarque concerne la séparation des glycannes liés O-glycosidiquement de ceux liés N-glycosidiquement. La gel-filtration fournit une séparation relative, mais non quantitative après hydrolyse pronasique. En revanche, après hydrolyse alcaline ménagée, la séparation est nette pourvu que la géométrie des colonnes et les volumes de gel soient adaptés à la quantité fractionnée. Les éventuelles pertes de matériel inhérentes au protocole de fractionnement peuvent être compensées par un apport supplémentaire au départ.

* Modèles cellulaires

Cette dernière remarque soulève non seulement la question de la quantité de cellules à cultiver, mais également la question de l'éloignement des conditions physiologiques : un modèle cellulaire *in vitro* est très éloigné de ce qui se passe réellement au cours de la tumorigenèse *in vivo*. Si l'on tient compte du fait que l'obtention de 10^{10} cellules (ce qui correspond à quelques grammes de matériel "frais") nécessite parfois plusieurs cycles de culture, il est aisément imaginable que ces cellules ne sont pas récoltées dans des états physiologiques identiques. Sachant que les glycoconjugués de la surface cellulaire subissent un recyclage ("turnover") en relation avec le cycle cellulaire, il est permis de penser que les structures exprimées à différents "états" physiologiques

seront différentes. Dans ces conditions, la présence transitoire d'un marqueur ne peut être décelée. Une approche qui nous paraît plus profitable au plan de la quantité de cellules au départ, serait la production de cellules tumorales directement *in vivo*. Nous avons observé des tumeurs clonales de masse largement supérieure au gramme, en injectant aussi peu que 10^4 ou 10^5 cellules transformées. Il serait envisageable d'injecter 10^6 à 10^7 cellules dans plusieurs animaux et obtenir ainsi, en un temps encore plus court, et dans des conditions totalement "naturelles", des masses de tissu cancéreux de plusieurs dizaines de grammes tout en respectant au mieux l'analogie qui existe entre la croissance et la différenciation tumorale *in vivo*. S'il est évident que cette approche poserait le problème du choix d'une cellule de "référence", elle permettrait néanmoins l'identification de molécules sur-exprimées à la surface des cellules tumorales *in situ*.

* Effets de l'oncogène *ras*

L'implication de l'oncogène *ras* dans les altérations de la glycosylation est précisée par nos travaux. Nous savons à présent que la transformation est accompagnée de l'augmentation de l'activité sialyltransférase et des travaux antérieurs ont montré la multi-antennarisation dans ce système, mais il est probable que d'autres activités enzymatiques soient affectées. Une étude actuellement en cours dans notre laboratoire (résultats non présentés) montre l'apparition d'acide N-glycolylneuraminique dans les cellules transformées par *ras*. L'analyse d'autres activités glycosyltransférases est la suite logique de ces travaux, de même que la recherche de variants cellulaires chez lesquels l'effet de l'oncogène puisse être "éteint" expérimentalement (par exemple des mutants thermosensibles), de manière à vérifier la réversibilité du phénomène. Ceci nous permettrait d'aborder les mécanismes régulateurs du système et de découvrir d'éventuelles étapes du processus reliant l'expression de l'oncogène aux modifications de la glycosylation. Un effet direct de la protéine p21^{ras} sur les activités glycosyltransférases nous semble improbable pour des raisons topologiques, mais ne peut être exclu *a priori*. En revanche, un effet lié au métabolisme du GTP ou aux mouvements intracellulaires de calcium pourrait affecter l'expression de certaines protéines enzymatiques ou la régulation de leurs activités.

* Question de la cellule "normale"

Nous nous sommes heurté, au cours de nos travaux, à l'épineux problème de la cellule "normale". Nous avons le sentiment que cette notion est très relative : ainsi, les cellules NIH 3T3, qui sont "normales" au sens de "non tumorigènes" et incapables de former des clones dans un milieu gélosé, peuvent subir des altérations phénotypiques caractéristiques de la transformation par le simple fait d'une confluence excessive. De même, les cellules BHK 21 dont nous disposons s'avèrent tumorigènes et capables de former des clones en agar. Les variations des conditions de culture, quoique minimisées par des précautions parfois draconiennes, peuvent se rendre responsables de la transformation *in vitro* de souches cellulaires "normales". *In vivo*, le problème est encore plus complexe, dans la mesure où le système immunitaire assure une défense active à l'encontre des cellules "a-normales" masquant ainsi en grande partie leurs effets, sans pour autant

réussir leur élimination totale. La cellule peut s'engager sur la voie de la malignité sans aucune "raison" apparente, répondant parfois à un stimulus qu'elle a reçu des années auparavant, à l'exemple des cancers du poumon se développant chez des sujets tabagiques. Dans les études expérimentales de la biologie du cancer, la définition de la cellule "normale" semble impossible. Il est plus aisé de définir une cellule "de référence", tout en prenant les dispositions qui permettent de vérifier son comportement *in vivo*.

* Conclusion

Nos travaux se placent dans le cadre de la recherche sur la métastase des tumeurs solides. La dérive maligne des cellules transformées par l'oncogène *ras* s'accompagne de modifications de molécules exprimées à la surface de ces cellules, et qui sont considérées comme des marqueurs de cette transformation. Le rôle de l'oncogène ainsi que la suite des étapes conduisant à l'acquisition du phénotype malin pourront être abordés dans l'avenir sur la base des résultats obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

- Abercombie M & Ambrose EJ, 1958 16
Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture
Exp. Cell Res. 15 : 332-336
- Abercombie M & Heaysman JEM, 1954 16
Observations on the social behaviour of cells in tissue culture II. "Monolayering of fibroblasts"
Exp. Cell Res. 6 : 293-306
- Abercombie M, Heaysman JEM & Karthausser HM, 1957 16
Social behaviour of cells in tissue culture III. "Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts"
Exp. Cell Res. 13 : 276-291
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD, 1983 29, 37
in "Molecular biology of the cell", Garland, New York
- Altevogt P, Fogel M, Cheingsong-Popov R, Dennis J, Robinson P & Schirmacher V, 1983 45
Different patterns of lectin binding and cell-surface sialylation detected on related high- and low-metastatic tumor lines
Cancer Res. 43 : 5138-5144
- Ambrose EJ & Easty DM, 1967 16
Biological and chemotherapeutic applications of cell culture methods in "The cancer cell *in vitro*", Butterworths, London, pp32-40
- Anderson MLM & Spandidos DA, 1988 17
Onco - suppressor genes and their involvement in cancer
Anticancer Res. 8 : 873-880
- Ashman L, 1987 46
The immunogenicity of tumour cells
Immunol. Cell Biol. 65: 271-277
- Aub JC, Tieslau C & Lankaster A, 1963 25
Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50 : 613-619
- Aub JC, Sanford BH & Cote MN, 1965 25
Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54 : 396-399
- Aub JC, Sanford BH & Wang L, 1965a 25
Relations of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54 : 400-402

- Barbacid M, 1987 50
ras genes
Ann. Rev. Biochem. 56: 779-827
- Bargmann CI, Hung MC & Weinberg RA, 1986 17
 Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185
Cell 45 : 649-657
- Ben-Ze'ev A, 1985 16
 The cytoskeleton in cancer cells
Biochim. Biophys. Acta 780: 197-212
- Ben-Ze'ev A, 1987 37
 The role of changes in cell shape and contacts in the regulation of cytoskeleton expression during differentiation
J. Cell Sci. Suppl. 8 : 293-312
- Bernstein SC & Weinberg RA, 1985 50
 Expression of the metastatic phenotype in cells transfected with human tumor DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 1726-1730
- Berridge MJ, 1987 42
 Inositol triphosphate and diacylglycerol : two interacting second messengers
Ann. Rev. Biochem. 56: 159-193
- Bett WR, 1957 13, 14, 15
 Historical aspects of cancer in "Cancer", R.W. Raven Ed., Butterworth, pp1-7
- Bishop JM, 1981 17
 Enemies within : the genesis of retrovirus oncogenes
Cell 23 : 5-6
- Bishop JM, 1983 17
 Cellular oncogenes and retroviruses
Ann. Rev. Biochem. 52: 301-354
- Bishop JM, 1985 17
 Viral oncogenes
Cell 42: 23-3.
- Bishop JM, 1987 19
 The molecular genetics of cancer
Science 235: 305-31.
- Bissell MJ & Barcellos-Hoff M-H, 1987 37
 The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message ?
J. Cell Sci. Suppl. 8 : 327-343
- Bissell MJ, Hall GH & Parry G, 1982 37
 How does the extracellular matrix direct gene expression ?
J. Theor. Biol. 99: 31-68

- Blomhoff HK, Smeland EB, Beiske K, Blomhoff R, Ruud E, Bjørø T, Pfeifer-Ohlsson S, Watt R, Funderud S, Godal T & Ohlsson R, 1987 50
 Cyclic AMP-mediated suppression of normal and neoplastic B-cell proliferation is associated with regulation of *myc* and *Ha-ras* proto-oncogenes
J. Cell. Physiol. 131: 426-433
- Blumberg PM, 1988 42
 Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters : Sixth Rhoads Memorial Award lecture
Cancer Res. 48 : 1-8
- Bolscher JGM, van der Bijl MMW, Neeffjes JJ, Hall A, Smets LA & Ploegh HL, 1988 50
Ras (proto)oncogene induces N-linked carbohydrate modification : temporal relationship with induction of invasive potential
EMBO J. 7 : 3361-3368
- Bradley MM, Kraynak AR, Storer RD & Gibbs JB, 1986 50
 Experimental metastasis in nude mice of NIH 3T3 cells containing various *ras* genes
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 : 5277-5281
- Brisson JR & Carver JP, 1983 24
 Solution conformation of α D(1-3)- and α D(1-6)-linked oligomannosides using proton nuclear magnetic resonance
Biochemistry (U.S.A.) 22 : 1362-1368
- Brisson JR & Carver JP, 1983a 24
 Solution conformation of asparagine-linked oligosaccharides : α (1-2)-, α (1-3)-, β (1-2)- and β (1-4)-linked units
Biochemistry (U.S.A.) 22 : 3671-3680
- Brisson JR & Carver JP, 1983b 24
 Solution conformation of asparagine-linked oligosaccharides : α (1-6)-linked moiety
Biochemistry (U.S.A.) 22 : 3680-3686
- Buck CA & Horwitz AF, 1987 37
 Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion
J. Cell Sci. Suppl. 8 : 231-250
- Bugelski PJ, Kirsh R, Buscarino C, Corwin SP & Poste G, 1987 46
 Recruitment of exogenous macrophages into metastases at different stages of tumor growth
Cancer Immunol. Immunother. 24 : 93-98
- Burnet FM, 1964 46
 Immunological factors in the process of carcinogenesis
Br. Med. Bull. 20 : 154-158
- Burnet FM, 1970 46
 The concept of immunological surveillance
Prog. Exp. Tumor Res. 13 : 1-27

- Cardon P, Paz Parente J, Leroy Y, Montreuil J & Fournet B, **1986** 71
 Separation of sialyl-oligosaccharides by high performance liquid chromatography.
 Application to the analysis of mono-, di-, tri- and tetrasialyl-oligosaccharides obtained
 by hydrazinolysis of α 1-acid glycoprotein
J. Chromatogr. 356 : 135-146
- Carter RL, **1976** 16
 Metastasis
 in "Scientific Foundations of Oncology", T. Symington & R.L. Carter Eds,
 William Heinemann, London, pp172-178
- Castagna M, **1987** 42
 Phorbol esters as signal transducers and tumor promoters
Biol. Cell 59 : 3-14
- Cazlaris H, **1986** 49, 116
 Modifications de la glycosylation des glycoprotéines membranaires en relation
 avec le pouvoir métastasant des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis
 DEA, Univ. Sci. Tech. Lille ; Lab. Chim. Biol.
- Chambers AF & Tuck AB, **1988** 19, 50
 Oncogene transformation and the metastatic phenotype
Anticancer Res. 8 : 861-872
- Chang EH, Furth ME, Scolnick EM & Lowy DR, **1982** 50
 Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene
 homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus
Nature 297 : 479-482
- Codington JF, Deak M-R, Frim DM & Jeanloz RW, **1986** 45
 Evidence for the presence of an N-acetylglucosamine type chain in epiglycanin
Arch. Biochem. Biophys. 251 : 47-54
- Collard JG, Schijven JF, Bikker A, La Rivière G, Bolscher JGM & Roos E, **1986** 45
 Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas
Cancer Res. 46 : 3521-3527
- Collard JG, Schijven JF & Roos E, **1987** 50
 Invasive and metastatic potential induced by *ras* transfection into mouse BW 51447
 T-lymphoma cells
Cancer Res. 47 : 754-759
- Corfield AP & Schauer R, **1982** 24
 Occurrence of Sialic Acids
 in "Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and function" R. Schauer Ed., Springer-Verlag,
 Wien, pp 5-50
- Davenport EA, Drobos B, Menke SL, Vaidya TB & Taparowsky EJ, **1988** 19
 Cooperation of oncogenes in the multistep transformation of established fibroblasts
 in culture
Anticancer Res. 8 : 959-970

- Debray H, Delannoy P, Debeire P & Montreuil J, **1983** 43, 48
 Isolation and characterisation of glycopeptides from virus-transformed Baby Hamster Kidney cells
Proc. 7th Int. Symp. Glycoconj., Lund-Ronneby, Sweden, pp172-173
- Debray H, Qin Z, Delannoy P, Montreuil J, Dus D, Radzikowski C, Christensen B & Kieler J, **1986** 44, 49
 Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines
Int. J. Cancer **37** : 607-611
- Debray H, **1989** 49
 Contribution à l'étude des modifications affectant les glycannes des N-glycosylprotéines membranaires lors de la transformation maligne des cellules et de la diffusion métastatique
Thèse 772, Univ. Sci. Tech. Lille.
- Delannoy P, Debray H & Montreuil J, **1985** 44, 48
 Modifications de la structure des glycannes de la fibronectine provoquées par la transformation des cellules BHK 21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster
C. R. Acad. Sci. (Paris) **301** : 767-771
- Dennis JW, **1986** 44
 Different metastatic phenotypes in two genetic classes of wheat germ agglutinin-resistant tumor cell mutants
Cancer Res. **46** : 4594-4600
- Dennis JW, **1986** 44
 Effects of swainsonine and polyinosinic:polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis
Cancer Res. **46** : 5131-5136
- Dennis JW & Laferté S, **1987** 46, 47
 Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype
Cancer Metast. Rev. **5** : 185-204
- Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML & Kerbel RS, **1987** 44
 β 1-6 branching of asparagine-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis
Science **236** : 582-585
- Der CJ, Krontiris TG & Cooper GM, **1982** 50
 Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79** : 3637-3640
- Der CJ, **1987** 19
 Cellular oncogenes and human carcinogenesis
Clin Chem. **33** : 641-646
- De Santis R, Santer UV & Glick M-C, **1987** 44
 NIH 3T3 cells transfected with human tumor DNA lose the transformed phenotype when treated with swainsonine
Biochim. Biophys. Res. Commun. **142** : 348-353

- De Vos AM, Tong L, Milburn MV, Matias PM, Jancarik J, Noguchi S, Nishimura S, Miura K, Ohtsuka E & Kim S, **1988** 50
 Three-dimensional structure of an oncogene protein : Catalytic domain of human c-H-ras p21
Science **239** : 888-893
- Dulbecco R, **1970** 16
 Topo inhibition and serum requirement of transformed and untransformed cells
Nature **227** : 802-806
- Dus D, Budzynski W & Radzikowski C, **1985** 49
 LL2 cell line derived from transplantable murine Lewis Lung Carcinoma. Maintenance in vitro and growth characteristics
Arch. Immunol. Ther. Exp. **33** : 817-823
- Edelman GM, **1985** 39
 Cell adhesion and the molecular process of morphogenesis
Ann. Rev. Biochem. **54** : 135-169
- Egan SE, Wright JA, Jarolim L, Yanagihara K, Bassin RH & Greenberg AH, **1987** 50
 Transformation by oncogenes encoding protein kinases induces the metastatic phenotype
Science **238** : 202-205
- Egan SE, Mc Clarty GA, Jarolim L, Wright JA, Spiro I, Hager G & Greenberg AH, **1987a** 50
 Expression of Ha-ras correlates with metastatic potential. Evidence for direct regulation of the metastatic phenotype in 10T1/2 and NIH 3T3 cells
Mol. Cell. Biol. **7** : 830-837
- Embleton MJ, Habib NA, Garnett MC & Wood C, **1986** 48
 Unsuitability of monoclonal antibodies to oncogene products for anti-tumor drug targeting
Int. J. Cancer **38** : 155-160
- Escribano M-J, Cordier J, Nap M, Ten Kate FJW & Burtin P, **1986** 46
 Differentiation antigens in fetal human pancreas. Reexpression in cancer
Int. J. Cancer **38** : 155-160
- Esselman WJ, Laine RA & Sweeley CC, **1972** 69
 Isolation and characterization of glycosphingolipids
Meth. Enzymol. **28 (B)** : 140-156
- Evans R, **1986** 46
 The immunological network at the site of tumor rejection
Biochim. Biophys. Acta **865** : 1-11
- Feizi T, **1985** 43
 Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens
Nature **314** : 53-57

- Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF & Vallee BL, 1985 39
 Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells
Biochemistry (U.S.A.) 24 : 5480-5486
- Fidler IJ, Gersten DM & Hart IR, 1978 39, 47
 The biology of cancer invasion and metastasis
Adv. Cancer Res. 28 : 149-250
- Fidler IJ, 1978 46
 Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis
Cancer Res. 38 : 2651-2660
- Fidler IJ, 1978a 52
 General considerations for studies of experimental cancer metastasis
Meth. Cancer Res. 15 : 399-439
- Fidler IJ, 1986 52
 Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis
Cancer Metast. Rev. 5 : 29-49
- Finne J, Burger MM & Prieels J-P, 1982 45
 Enzymatic basis for a lectin-resistant phenotype. Increase in a fucosyltransferase in mouse melanoma cells
J. Cell Biol. 92 : 277-282
- Fishman PH & Brady RO, 1976 25
 Biosynthesis and function of gangliosides
Science 194 : 906-915
- Florey HW, 1970 13
 The History and Scope of Pathology
 in "General Pathology", Lord H.W. Florey Ed., Lloyd-Luke, London, pp1-2
- Foidart JM, Bere JJ, Paglia L, Rennard SI, Gullino M Martin GR & Katz SI, 1980 37
 Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a non collagenous basement membrane glycoprotein
Lab. Invest. 42 : 336-342
- Folkman J & Klagsbrun M, 1987 39
 Angiogenic factors
Science 235 : 442-447
- Folkman J, 1985 39
 Tumor angiogenesis
Adv. Cancer Res. 43 : 175-203
- Folkman J, 1987 41
 What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma ?
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23 : 361-363

- Fulton AM, 1987 47
 Interactions of natural effector cells and prostaglandins in the control of metastasis
J. Natl. Cancer Inst. **78** : 735-741
- Furth ME, Aldrich TH & Cordon-Carlo C, 1987 50
 Expression of *ras* proto-oncogene proteins in human tissues
Oncogene **1** : 47-58
- Gabius H-J, Bokemeyer C, Hellmann T & Schmoll H-J, 1987 48
 Targeting of neoglycoprotein-drug conjugates to cultured human embryonal carcinoma cells
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **113** : 126-130
- Gabius H-J, 1987 47
 Endogenous lectins in tumors and the immune system
Cancer Invest. **5** : 39-46
- Gaffrey JM, Brown AM & Schneider MD, 1987 43
 Mitogens and oncogenes can block the induction of specific voltage-gated ion channels
Science **236** : 570-573
- Garrett CT, 1986 17, 19
 Critical review : Oncogenes
Clin. Chim. Acta **156** : 1-40
- Gentry LE, Webb NR, Lim J, Brunner AM, Ranchalis JE, Twardzik DR, Lioubin MN, Marquardt H & Purchio AF, 1987 21
 Type 1 TGF- β : amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese Hamster Ovary cells
Mol. Cell. Biol. **7** : 3418-3427
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T & Sharon N, 1980 34
 What should be called a lectin ?
Nature **285** : 66
- Gospodarowicz D, 1988 21
 Molecular and developmental biology aspects of fibroblast growth factor in "Biology of Growth Factors", J.E. Kudlow, D.H. McLellan, A. Bernstein & A.I. Gotlieb Eds., *Adv. Exp. Med. Biol.* **234** : 23-39
- Göttlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM & Riethmüller G, 1986 47
 The epithelial cell surface antigen 17-1A a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies
Int. J. Cancer **38** : 47-53
- Gottschalk A & Graham ERB, 1959 25
 6- α -D-sialyl-N-acetylgalactosamine : the neuraminidase-susceptible prosthetic group of bovine salivary mucoprotein
Biochim. Biophys. Acta **34** : 386-391

- Goustin AS, Leof EB, Shipley GD & Moses HL, 1986 22, 39
 Growth factors and cancer
Cancer Res. **46** : 1015-1029
- Graham FL & Van der Eb AJ, 1973 19, 52
 A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
Virology **52** : 456-467
- Greig RT, Koestler TP, Trainer DL, Corwin SP, Miles L, Kline T, Sweet R, Yokohama S & Poste G, 1985 50
 Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH 3T3 cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82** : 3698-3701
- Grimstad IA, 1987 39
 Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion
Exp. Cell Res. **173** : 515-523
- Hadwiger A, Niemann H, Kabisch A, Bauer H & Tamura T, 1986 44
 Appropriate glycosylation of the *fms* gene product is a prerequisite for its transforming potency
EMBO J. **5** : 689-694
- Hagag N, Lacal J-C, Graber M, Aaronson S & Viola MV, 1987 50
 Microinjection of *ras* p21 induces a rapid rise in intracellular pH
Mol. Cell. Biol. **7** : 1984-1988
- Hagmar B, Ryd W & Erkell LJ, 1984 47
 Why do tumours metastasize ? An overview of current research
Tumour Biol. **5** : 141-149
- Hagopian A & Eylar EH, 1968 24
 Glycoprotein biosynthesis : Studies on the receptor specificity of the polypeptidyl :
 N-acetyl-galactosaminyltransferase from bovine submaxillary glands
Arch. Biochem. Biophys. **128** : 422-433
- Hakomori S, 1981 45
 Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis
Ann. Rev. Biochem. **50** : 733-764
- Hakomori S, 1983 24, 25, 45
 Chemistry of glycosphingolipids
in "Sphingolipid Biochemistry" J. N. Kanfer & S. Hakomori Eds, Plenum, New York, pp 1-166
- Hakomori S, 1984 25, 43, 45
 Tumor-associated carbohydrate antigens
Ann. Rev. Immunol. **2** : 103-126
- Hakomori S, 1985 45, 46
 Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids : overview and perspectives
Cancer Res. **45** : 2405-2414

- Hakomori S, 1986 45, 46
 Tumor-associated glycolipid antigens, their metabolism and organization
Chem. Phys. Lipids 42 : 209-233
- Hakomori S & Kannagi R, 1983 43, 45, 46
 Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers
J. Natl. Cancer Inst. 71 : 231-251
- Hanna N, 1985 46
 The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis
Biochim. Biophys. Acta 780 : 213-226
- Harvey JJ, 1964 50
 An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice
Nature 204 : 1104-1105
- Heldin C-H & Westermark B, 1984 21
 Growth factors : mechanism of action and relation to oncogenes
Cell 37 : 9-20
- Herd ZL, 1987 47
 Suppression of B16 melanoma lung colonization by syngeneic monoclonal antibodies
Cancer Res. 47 : 2696-2703
- Honn KW, Steinert BW, Onoda JM & Sloane BF, 1987 46
 The role of platelets in metastasis
Biorheology 24 : 127-137
- Hubbard SC, 1987 44
 Differential effects of oncogenic transformation on N-linked oligosaccharide processing at individual glycosylation sites of viral glycoproteins
J. Biol. Chem. 262 : 16403-16411
- Humphries MJ, Matsumoto K, White SL & Olden K, 1986 44
 Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors
Cancer Res. 46 : 5215-5222
- Humphries MJ, Matsumoto K, White SL & Olden K, 1986a 44
 Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 : 1752-1756
- Humphries MJ, Matsumoto K, White SL, Molyneux RJ & Olden K, 1988 44
 Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antitumour immunomodulator
Cancer Res. 48 : 1410-1415
- Hunter T, 1985 19
 Oncogenes and growth control
Trends Biochem. Sci. 10 : 275-280

- Hunter T, 1987 42, 43
 A thousand and one proteine kinases
Cell 50 : 823-829
- Hynes R, 1985 37
 Molecular biology of fibronectin
Ann. Rev. Cell Biol. 1 : 67-90
- Iannaccone PM, Weinberg WC & Deamant FD, 1987 47
 On the clonal origin of tumors : A review of experimental models
Int. J. Cancer 39 : 778-784
- Inbar M & Sachs L, 1969 25
 Interaction of the carbohydrate-binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63 : 1418-1425
- Irimura T, Gonzalez R & Nicolson GL, 1981 44
 Effects of tunicamycin on B16 metastatic melanoma cell surface glycoproteins and blood-borne arrest and survival properties
Cancer Res. 41 : 3411-3418
- Jainchill JS, Aaronson SA & Todaro GS, 1969 49
 Murine sarcoma and leukemia viruses : assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells
J. Virol. 4 : 549-553
- Junker JL & Heine UI, 1987 37
 Effect of adhesion factors fibronectin, laminin and type IV collagen on spreading and growth of transformed and control rat liver epithelial cells
Cancer Res. 47 : 3802-3807
- Jurnak F, 1988 50
 The three-dimensional structure of c-H-ras p21: implications for oncogene and G protein studies
Trends Biochem. Sci. 13 : 195-198
- Kahn P & Shin S, 1979 52
 Cellular tumorigenicity in nude mice
J. Cell Biol. 82 : 1-16
- Kaplan HA, Weply JK & Lennarz WJ, 1987 31
 Oligosaccharyl transferase : the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly
Biochim. Biophys. Acta 906 : 161-173
- Katz E & Carter BJ, 1986 50
 Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH 3T3 cells by *ras* gene and on tumorigenicity of an NIH 3T3 transformed cell line
Cancer Res. 46 : 3023-3026
- Kellie S, 1988 42
 Cellular transformation, tyrosine kinase oncogenes and the cellular adhesion plaque
BioEssays 8 : 25-30

- Kerbel RS, Dennis JW, Lagarde AE & Frost P, 1982 49
 Tumor progression in metastasis : an experimental approach using lectin resistant tumor variants
Cancer Metast. Rev. 1 : 99-140
- Kerbel RS, Waghorne C, Man MS, Elliott B & Breitman ML, 1987 52
 Alteration of the tumorigenic and metastatic properties of neoplastic cells is associated with the process of calcium phosphate-mediated DNA transfection
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 1263-1267
- Keski-Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ Jr & Moses HL, 1987 21
 Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth
J. Cell. Biochem. 33 : 95-107
- Kiguchi K, Henning-Chubb C & Huberman E, 1986 42
 Alteration in glycosphingolipid pattern during phorbol-12-myristate-13-acetate-induced cell differentiation in human T-lymphoid leukemia cells
Cancer Res. 46 : 3027-3033
- Kirsten WH & Mayer LA, 1967 50
 Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus
J. Natl. Cancer Inst. 39 : 311-335
- Klein G & Klein E, 1985 17, 19, 47
 Evolution of tumors and the impact of molecular oncology
Nature 315 : 190-195
- Klein G, 1987 17
 The approaching new era of the tumor suppressor genes
Science 238 : 1539-1545
- Kobata A, 1984 24
 The carbohydrates of glycoproteins
 in "Biology of Carbohydrates" 2, V. Ginsburg & P. W. Robbins Eds., Wiley, New York, pp 88-161
- Kobata A, 1987 24, 25
 Malignant transformational changes of the sugar chains of glycoproteins and their clinical value in "Development and Recognition of the Transformed Cell" M.I. Greene and T. Hamaoka Eds., Plenum, New York, pp 385-405
- Kris RM, Avivi A, Bar-Eli M, Alon Y, Carmi P, Schlessinger J & Raz A, 1985 50
 Expression of Ki-ras oncogene in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities
Int. J. Cancer 35 : 227-230
- Kulesh DA & Greene JJ, 1986 47
 Shape-dependent regulation of proliferation in normal and malignant human cells and its alteration by interferon
Cancer Res. 46 : 2793-2797

- Laferté S, Fukuda MN, Fukuda M, Dell A & Dennis JW, 1987 45
 Glycosphingolipids of lectin-resistant mutants of the highly metastatic mouse tumor cell line, MDAY-D2
Cancer Res. 47 : 150-159
- Land H, Parada LF & Weinberg RA, 1983 19
 Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes
Nature 304 : 596-602
- Lawler J, 1986 37
 Review : The structural and functional properties of thrombospondin
Blood 67 : 1197-1209
- Lee YC & Scoocca JR, 1972 116
 A common structural unit in asparagine-oligosaccharides of several glycoproteins from different sources
J. Biol. Chem. 247 : 5753-5758
- Lemoine NR, Wynford-Thomas V & Wynford-Thomas D, 1987 19
 Optimisation of conditions for detection of activated oncogenes by transfection of NIH 3T3 cells
Br. J. Cancer 55 : 639-642
- Lerman MI, Hegamyer GA & Colburn NH, 1986 42
 Cloning and characterization of putative genes that specify sensitivity to neoplastic transformation by tumor promoters
Int. J. Cancer 37 : 293-309
- Lerman MI, Sakai A, Yao K, Colburn NH, 1987 42
 DNA sequences in human nasopharyngeal carcinoma cells that specify susceptibility to tumor promoter-induced neoplastic transformation
Carcinogenesis 8 : 121-127
- Levi-Montalcini R, 1987 21
 The Nerve Growth Factor : thirty-five years later
EMBO J. 6 : 1145-1154
- Liener IE, Sharon N & Goldstein IJ, 1986 34
 in "The Lectins", Liener I.E., Sharon N. & Goldstein I.J. Eds., Academic Press, Orlando
- Liotta LA, Rao CN & Barsky SH, 1983 39
 Tumor invasion and the extracellular matrix
Lab. Invest. 49 : 636-649
- Liotta LA, Rao CN & Wewer UM, 1986 16
 Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane
Ann. Rev. Biochem. 55 : 1037-1057

- Lis H & Sharon N, 1984 34
 Lectins : Properties and applications to the study of complex carbohydrates in solution on cell surfaces
in "Biology of Carbohydrates" 2, V. Ginsburg & P. W. Robbins Eds., Wiley, New York, pp 1-85
- Loucheux-Lefebvre M-H, 1987 17
 Activation des oncogènes par mutation ponctuelle
Méd. Sci. 3 : 33-46
- MacPherson I, 1963 48
 Characteristics of a Hamster cell clone transformed by polyoma virus
J. Natl. Cancer Inst. 30 : 795-815
- MacPherson I & Stoker M, 1962 48
 Polyoma transformation of Hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence
Virology 16 : 147-151
- Maes P, Damart D, Rommens C, Montreuil J, Spik G & Tartar A, 1988 39
 The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin
FEBS Lett. 241 : 41-45
- Malter M, Friedrich E & Süss R, 1986 46
 Liver as a tumor-killing organ : Kupffer cells and natural killers
Cancer Res. 46 : 3055-3060
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J, 1982 62
in "Molecular cloning. A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Mareel MM & Van Roy FM, 1986 39
 Are oncogenes involved in invasion and metastasis ?
Anticancer Res. 6 : 419-436
- Mareel MM, Van Roy FM, Messiaen LM, Boghaert ER & Bruyneel EA, 1987 39
 Qualitative and quantitative analysis of tumor invasion *in vivo* and *in vitro*
J. Cell Sci. Suppl. 8 : 141-163
- Matsuno T, 1987 16
 Minireview : Bioenergetics of tumor cells : Glutamine metabolism in tumor cell mitochondria
Int. J. Biochem. 19 : 303-307
- Matyas GR, Aaronson SA, Brady RO & Fishman PH, 1987 50
 Alteration of glycolipids in *ras*-transfected NIH 3T3 cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 6065-6068
- Mc Bride WH, 1986 46
 Phenotype and functions of intratumoral macrophages
Biochim. Biophys. Acta 865 : 27-41

- Merkle RK & Cummings RD, 1987 70
Lectin affinity chromatography of glycopeptides
Meth. Enzymol. **138** : 232-359
- Montagnier L & MacPherson I, 1964 48
Croissance sélective en gélose de cellules de Hamster transformées par le virus du Polyome
C. R. Acad. Sci. (Paris) **258** : 4171-4173
- Montesano R, Drevon C, Kuroki T, Saint Vincent L, Handleman S, Sanford KK, De Feo D & Weinstein BI, 1977 16
Test for malignant transformation of rat liver cells in culture : Cytology, growth in soft agar and production of plasminogen activator
J. Natl. Cancer Inst. **59** : 1651-1658
- Montreuil J, 1980 24, 31
Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **37** : 157-223
- Montreuil J, 1982 24, 31
in "Comprehensive Biochemistry" A. Neuberger & L.L.M. Van Deenen Eds, Elsevier, Amsterdam, **19B**, part. II, p. 1
- Montreuil J, 1984 24, 31
Spatial conformation of glycans and glycoproteins
Biol. Cell **51** : 115-132
- Montreuil J, 1984a 24, 31
Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function. Survey of a decade of research
Pure Appl. Chem. **56** : 859-877
- Montreuil J, 1987 24, 31, 49
Structure and conformation of glycoprotein glycans
in "Vertebrate Lectins", K. Olden & J. B. Perent Eds, Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp 1-29
- Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Fournet B, Spik G & Strecker G, 1986 70, 71, 72
Glycoproteins
in "Carbohydrate analysis. A practical approach" M. F. Chaplin & J. F. Kennedy Eds., IRL Press, Oxford, pp 143-204
- Morell AG, Gregoriades G, Scheinberg IH, Hickman J & Ashwell G, 1971 25
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation
J. Biol. Chem. **246** : 1461-1467
- Moskal JR, Lockney MW, Marvel CC, Trosko JE & Sweeley CC, 1987 42
Effect of retinoic acid and phorbol-12-myristate-13-acetate on glycosyltransferase activities in normal and transformed cells
Cancer Res. **47** : 787-790

- Mountford CE & Wright LC, 1988 35
 Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells :
 a new model
Trends Biochem. Sci. 13 : 172-177
- Naomoto Y, Kondo H, Tanaka N & Orita K, 1987 52
 Novel experimental models of human cancer metastasis in nude mice: lung metastasis,
 intraabdominal carcinomatosis with ascites, and liver metastasis
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113 : 544-549
- Neville AM, 1986 16
 Tumour markers and their clinical value
Tumour Biol. 7 : 83-90
- Nichols EJ, Manger R, Hakomori S, Herscovics A & Rohrschneider LR, 1985 44
 Transformation by the *v-fms* oncogene product : Role of glycosylational processing
 and cell surface expression
Mol. Cell. Biol. 5 : 3467-3475
- Nichols EJ, Manger R, Hakomori S & Rohrschneider LR, 1987 44
 Transformation by the oncogene *v-fms* : the effects of castanospermine on
 transformation-related parameters
Exp. Cell Res. 173 : 486-495
- Nicolson GL, 1982 16, 45, 46, 47
 Cancer metastasis. Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells
Biochim. Biophys. Acta 695 : 113-176
- Nicolson GL, 1987 47
 Oncogenes, genetic instability and evolution of the metastatic phenotype
Adv. Viral Oncol. 6 : 143-168
- Nicolson GL, 1987a 47
 Tumor cell instability diversification and progression to the metastatic phenotype :
 from oncogene to oncofetal expression
Cancer Res. 47 : 1473-1487
- Niemtzow RC, 1987 43
 Use of transmembrane potentials in the identification of tumour cells
Cancer Surv. 6 : 269-283
- Nigam VN, Brailowski CA & Bonaventure J, 1982 45
 Glycosaminoglycans and proteoglycans in neoplastic tissues and their role in tumor
 growth and metastasis in "Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Physiological
 and Pathological processes of body systems" S. Karger, Basel, pp 354-371
- Nishimura S & Sekiya T, 1987 19
 Human cancer and cellular oncogenes
Biochem. J. 243 : 313-327

- Nishizuka Y, 1988 42
 The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation
Nature 334 : 661-665
- Nowell PC, 1960 25
 Phytohemagglutinin : an inhibitor of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. 20 : 462-466
- Nowell PC, 1986 19
 Mechanisms of tumor promotion
Cancer Res. 46 : 2203-2207
- Nudelman E, Kannagi R, Hakomori S, Lipinsky M, Wiels J, Fellous M & Tursz T, 1983 45
 A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma by monoclonal antibody
Science 220 : 509-511
- Oliver GJA & Hemming FW, 1975 68
 The transfer of mannose to dolichol phosphate oligosaccharides in pig liver endoplasmic reticulum
Biochem. J. 152 : 191-199
- Osawa T & Tuji T, 1987 70
 Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins
Ann. Rev. Biochem. 56 : 21-42
- Papageorge AG, De Feo-Jones D, Robinson P, Temeles G & Scolnick EM, 1984 17
Saccharomyces cerevisiae synthesizes proteins related to the p21 gene product of *ras* found in mammals
Mol. Cell. Biol. 4 : 23-29
- Parada LF, Tabin CJ, Shih C & Weinberg RA, 1982 50
 Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene
Nature 297 : 474-478
- Parish RW, Schmidhauser C, Schmidt T & Dudler T, 1987 16, 17, 39
 Mechanism of tumour cell metastasis
J. Cell Sci. Suppl. 8 : 181-197
- Paz Parente J, Leroy Y, Montreuil J & Fournet B, 1984 71
 Separation of sialyl oligosaccharides by high performance liquid chromatography. Application to the analysis of carbohydrate units of acidic oligosaccharides obtained by hydrazinolysis of hen ovomucoid
J. Chromatogr. 288 : 147-155
- Pearse BMF, 1987 48
 Clathrin and coated vesicles
EMBO J. 6 : 2507-2512
- Pharmacia*, 1986 67
 "Microcarrier Cell Culture Principles & Methods" Pharmacia Biotechnology AB Ed., Almquist & Wikse, Uppsala

- Pierce M & Arango J, 1986 44
 Rous sarcoma virus-transformed Baby Hamster Kidney cells express higher levels of Asn-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNac- β (1,6)Man- α (1,6) Man] and poly N-acetyllactosamine sequences than BabyHamster Kidney cells
J. Biol. Chem. 261 : 10772-10777
- Pierce M, Arango J, Tahir SH & Hindsgaul O, 1987 44
 Activity of UDP-GlcNac : α -mannoside (β 1-6) GlcNAc-transferase (GnT V) in cultured cells using a synthetic trisaccharide acceptor
Biochim. Biophys. Res. Commun. 146 : 679-684
- Pinnaduwege PD, Bhavanandan VP & Davidson EA, 1986 45
 Characteristics of two WGA-resistant variants of B16 melanoma cells with reduced tumorigenicity
Carbohydr. Res. 151 : 37-50
- Pitot HC, 1978 13
 Cancer : Yesterday and Today
 in "Fundamentals of Oncology", Dekker, New York, pp 3-4
- Poste G & Fidler IJ, 1980 47
 The pathogenesis of cancer metastasis
Nature 283 : 139-146
- Pozzatti R, Muschel R, Williams J, Padmanabhan R, Howard B, Liotta L & Khoury G, 1986 21
 Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials
Science 232 : 223-227
- Prehn RT & Prehn LM, 1987 15
 The autoimmune nature of cancer
Cancer Res. 47 : 927-932
- Raz A & Ben-Ze'ev A, 1987 37
 Cell-contact and architecture of malignant cells on their relationship to metastasis
Cancer Metast. Rev. 6 : 3-21
- Raz A, McLellan WL, Hart IR, Bucana CD, Hoyer LC, Sela BA, Dragsten P & Fidler I, 1980 47
 Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential
Cancer Res. 40 : 1645-1651
- Récamier JCA, 1829 14
 Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée et sur l'histoire générale de la même maladie. Gabor, Paris, 2, p. 110
- Redini F, Verrelle P, Hillova J, Poupon M-F & Moczar E, 1987 45
 Cell-surface glycosaminoglycans of a tumor cell line and its DNA transfected variant, differing in their lung colonizing potential
Glycoconjugate J. 4 : 191-201

- Rizzino A, Ruff E & Rizzino H, 1986 21
 Induction and modulation of anchorage-independent growth by PDGF, FGF and TGF- β
Cancer Res. 46 : 2816-2820
- Roos E, 1984 39
 Cellular adhesion, invasion and metastasis
Biochim. Biophys. Acta 738 : 263-284
- Ross R, Raines EW & Bowen-Pope DF, 1986 21
 The biology of Platelet-Derived Growth Factor
Cell 46 : 155-169
- Rothman JE & Lenard J, 1977 37
 Membrane asymmetry
Science 195 : 743-753
- Roussel MF, Dull TJ, Rettenmier CW, Ralph P, Ullrich A & Sherr CJ, 1987 21
 Transforming potential of the *c-fms* proto-oncogene (CSF-1 receptor)
Nature 325 : 549-552
- Sachs L, 1987 19
 Development and suppression of malignancy
Adv. Viral Oncol. 6 : 129-142
- Sadler JE, 1984 29
 Biosynthesis of glycoproteins : formation of O-linked oligosaccharides
 in "Biology of carbohydrates" 2, V. Ginsburg & P. W. Robbins Eds., Wiley, New
 York, pp 199-288
- San RHC, Laspia MF, Soiefer AI, Malansky CJ, Rice JM & Williams GM, 1979 16
 A survey of growth in soft agar and cell surface properties as markers for
 transformation in adult rat liver epithelial cell cultures
Cancer Res. 39 : 1026-1034
- Santer UV, Gilbert F & Glick M-C, 1984 50
 Change in glycosylation of membrane glycoproteins after transfection of NIH 3T3
 with human tumor DNA
Cancer Res. 44 : 3730-3735
- Saule S, 1987 19
 Les oncogènes des virus des leucémies aigües aviaires et leurs homologues
 cellulaires : structure et fonction
Thèse 714, Univ. Sci. Tech. Lille.
- Schachter H, Narasimhan S, Gleeson P, Vella G & Brockhausen I, 1985 24
 Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of protein-bound oligosaccharides
 of the Asn-GlcNAc and Ser(Thr)-GalNAc types in "The Enzymes of biological
 Membranes" 2 : 227-277
- Schauer R, 1982 24
 in "Sialic acids, Chemistry, Metabolism and Function" Cell Biol. Monogr. 10,
 Springer-Verlag, Wien

- Schirmacher V, Altevogt P, Fogel M, Dennis JW, Weller CA, Barz D, Schwartz R, Cheingsong-Popov R, Springer G, Robinson PJ, Nebe T, Brossmer W, Vlodaysky I, Paweletz N, Zimmerman H-P & Uhlenbruck G, 1982 45
 Importance of cell surface carbohydrates in cancer cell adhesion, invasion and metastasis. Does sialic acid direct metastatic behavior ?
Invas. Metastasis 2 : 313-360
- Schmitt HD, Wagner P, Pfaff E & Gallwitz D, 1986 17
 The ras-related YPT1 gene product in yeast : a GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization
Cell 47 : 401-412
- Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA & Vallee BL, 1987 39
 Isolation of angiogenin from normal human plasma
Biochemistry (U.S.A.) 26 : 5141-5146
- Sharon N, 1986 25, 31
 Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans
Eur. J. Biochem. 159 : 1-6
- Shimizu K, Goldbarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer J, Fogh J & Wigler MH, 1983 50
 Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 2112-2116
- Shinitzky M, 1984 37
 Membrane fluidity in malignancy : adversative and recuperative
Biochim. Biophys. Acta 738 : 251-261
- Sibley DR, Benovic JL, Caron MG & Lefcowitz RJ, 1987 43
 Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation
Cell 48 : 913-922
- Singer SJ & Nicolson GL, 1972 35
 The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Science 175 : 720-731
- Singletary ES, Baker FL, Spitzer G, Tucker SL, Tomasovic B, Brock WA, Ajani JA & Kelly AM, 1987 21
 Biological effect of EGF on the *in vitro* growth of human tumors
Cancer Res. 47 : 403-406
- Smets LA & Van Beek WP, 1984 16
 Carbohydrates of the tumor cell surface
Biochim. Biophys. Acta 738 : 237-249
- Snider MD, 1984 31
 Biosynthesis of glycoproteins : formation of N-linked oligosaccharides
 in "Biology of carbohydrates" 2, V. Ginsburg & P. W. Robbins Eds., Wiley, New York, pp 164-198

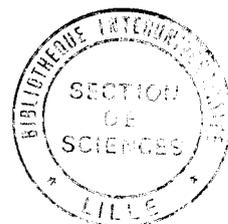
- Solter D & Knowles BB, 1978 43
 Monoclonal antibodies defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 : 5565-5569
- Southern PJ & Berg P, 1982 52
 Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene
 under control of the SV40 early region promoter
J. Mol. Appl. Genet. 1 : 327-341
- Spandidos DA, 1986 47
 A unified theory for the development of cancer
Bioscience Rep. 6 : 691-708
- Spandidos DA, 1988 19
 Ras oncogenes in cell transformation
ISI Atlas of Science : Immunology 1 : 1-6
- Spandidos DA & Anderson MLM, 1987 19
 A study of mechanisms of carcinogenesis by gene transfer of oncogenes into
 mammalian cells
Mutat. Res. 185 : 271-291
- Spandidos DA & Siminovitch L, 1977 19
 Transfer of anchorage independence of isolated metaphase chromosomes in Hamster
 cells
Cell 12 : 675-682
- Spandidos DA & Siminovitch L, 1978 19
 Transfer of the marker for the morphologically transformed phenotype by isolated
 metaphase chromosomes in Hamster cells
Nature 271 : 259-261
- Spandidos DA & Wilkie NM, 1984 17
 Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human
 oncogene
Nature 310 : 469-475
- Sporn MB & Roberts AB, 1985 19
 Autocrine growth factors and cancer
Nature 313 : 745-747
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM & de Crombrughe B, 1987 21
 Some recent advances in the chemistry and biology of TGF- β
J. Cell Biol. 105 : 1039-1045
- Stacey DW, 1988 50
 The ras pathway
 in "Biology of Growth Factors", J.E. Kudlow, D.H. McLellan, A. Bernstein & A.I.
 Gotlieb Eds., *Adv. Exp. Med. Biol.* 234 : 141-167
- Stacey DW & Kung H-F, 1984 50
 Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein
Nature 310 : 508-511

- Stacey DW, Watson T, Kung H-F & Curran T, 1987 50
 Microinjection of transforming *ras* protein induces *c-fos* expression
Mol. Cell. Biol. 7 : 523-527
- Steck PA, Cheong PH, Nakajima M, Yung AWK, Moser RP & Nicolson GL, 1987 45
 Altered expression of glycosaminoglycans in metastatic 13762 NF rat mammary
 adenocarcinoma cells
Biochemistry (U.S.A.) 26 : 1020-1028
- Stéhelin D, 1988 17
 Dissection moléculaire des cancers
Bull. Inst. Pasteur 86 : 225-242
- Stéhelin D, Varmus HE, Bishop JM & Vogt PK, 1976 19
 DNA related to the transforming genes of ASV is present in normal avian DNA
Nature 260 : 170-173
- Stocker MC, O'Neill C, Berryman S & Waxam V, 1968 39
 Anchorage and growth relation in normal and virus transformed cells
Int. J. Cancer 3 : 683-693
- Stryer L, 1981 29
 Proteoglycans from the ground substance of connective tissue in "Biochemistry",
 2nd Edn, L. Stryer Ed., Freeman, San Francisco
- Sugarbaker EV, 1981 47
 Patterns of metastasis in human malignancies
Cancer Biol. Rev. 2 : 235-278
- Svennerholm L, 1964 25
 The gangliosides
J. Lipid Res. 5 : 145-155 ; 1963 *J. Neurochem.* 10 : 613
- Svoboda J, 1986 14
 Rous sarcoma virus
Intervirology 26 : 1-60
- Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM,
 Dhar R, Lowy DR & Chang E, 1982 17, 50, 52
 Mechanism of activation of a human oncogene
Nature 300 : 143-149
- Tachibana T & Yoshida K, 1986 47
 Role of the regional lymph node in cancer metastasis
Cancer Metast. Rev. 5 : 55-66
- Tagliaferri P, Yanagihara K, Ciardiello F, Talbot N, Flatow U, Benade L
 & Bassin RH, 1987 43
 Effects of ouabain on NIH 3T3 cells transformed with retroviral oncogenes and on
 human tumor cell lines
Int. J. Cancer 40 : 653-658

- Takahashi K, Heine U, Junker JL, Colburn NH & Rice JM, 1986 50
 Role of cytoskeleton changes and expression of the Ha-*ras* oncogene during promotion of neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells
Cancer Res. 46 : 5923-5932
- Talmadge JE & Black PL, 1988 48
 Immunotherapy of metastatic disease
Sem. Thrombosis Hemost. 14 : 79-87
- Taniguchi S, Kawano T, Mitsudomi T, Kimura G & Baba T, 1986 50
fos oncogene transfer to a transformed rat fibroblast cell line enhances spontaneous lung metastases in rat
Jpn. J. Cancer Res. (GANN) 77 : 1193-1197
- Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M & Wigler M, 1983 50
 Structure and activation of the human N-*ras* gene
Cell 34 : 581-586
- Tarin D, 1985 47
 Clinical and experimental studies on the biology of metastasis
Biochim. Biophys. Acta 780 : 227-235
- Terranova VP, Hujanen ES & Martin GR, 1986 39
 Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells
J. Natl. Cancer Inst. 77 : 311-316
- Thorgeirsson UP, Turpeenniemi-Hujanen T, Williams JE, Westin EH, Heilman CA, Talmadge JE & Liotta LA, 1985 50
 NIH 3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated *ras* oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice
Mol. Cell. Biol. 5 : 259-262
- Torpier G & Montagnier L, 1969 37
 Corrélation entre la transformation des cellules BHK et l'affinité du rouge de ruthénium pour leur membrane cytoplasmique
Ann. Inst. Pasteur-Lille 20 : 203-210
- Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li D-J, Gennaro D, Buscarino C, Lynch M, Poste G & Greig R, 1988 19
Int. J. Cancer 41 : 287-296
- Turner GA, 1982 46
 Surface properties of the metastatic cell
Invas. Metastasis 2 : 197-216
- Van Rinsum J, Smets LA, Van Rooy H & van den Eijnden DH, 1986 46
 Specific inhibition of human natural killer cell-mediated cytotoxicity by sialic acid and sialo-oligosaccharide
Int. J. Cancer 38 : 915-922
- Varani J, Fligiel SEG & Wilson B, 1986 39, 43
 Motility of *ras* H oncogene transformed NIH 3T3 cells
Invas. Metastasis 6 : 335-346

- Varani J, Carey TE, Fligiel SEG, Mc Keever PE & Dixit V, 1987 39
 Tumor type-specific differences in cell-substrate adhesion among human tumor cell lines
Int. J. Cancer 39 : 397-403
- Varmus HE, 1984 17
 The molecular genetics of cellular oncogenes
Ann. Rev. Genet. 18 : 553-612
- Verbert A, Cacan R & Cecchelli R, 1987 31
 Membrane transport of sugar donors to the glycosylation sites
Biochimie 69 : 91-99
- Vliegenthart JFG, Dorland L & Van Halbeek H, 1984 73
 High-resolution, ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41 : 209-374
- Waghorne C, Kerbel RS & Breitman ML, 1987 50
 Metastatic potential of SP1 mouse mammary adenocarcinoma cells is differentially induced by activated and normal forms of c-Ha-ras
Oncogene 1 : 149-155
- Warren BA, 1980 47
 Origin and fate of blood-borne tumor emboli
Cancer Biol. Rev. 2 : 95-170
- Warren L, Buck CA & Tuszynski GP, 1978 46
 Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior
Biochim. Biophys. Acta 516 : 97-127
- Watkins WM, 1966 25
 Blood-group substances
Science 152 : 172-181
- Weinberg RA, 1982 17
 Oncogenes of spontaneous and chemically induced tumors
Adv. Cancer Res. 36 : 149-165
- Weinberg RA, 1982a 17
 Fewer and fewer oncogenes
Cell 30 : 3-4
- Weinstein IB, 1981 14, 15
 Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis
J. Supramolec. Struct. Cell. Biochem. 17 : 99-120
- Weiss L, Fisher B & Fisher ER, 1974 45
 Observations on the effect of neuraminidase on the distribution of intravenously injected Walker tumor cells in rats
Cancer 34 : 680-683

- Weiss L, Ward PM & Harlos JP, 1986 46
The stability of kidney-induced selection of Lewis Lung tumor cell populations, and their metastasis-related behavior
Int. J. Cancer 38 : 207-312
- Willis RA & Willis AT, 1972 15, 16
in "Principles of Pathology and Bacteriology" 3rd Edn, Butterworth, London
- Yamashita K, Okhura T, Tachibana Y, Takasaki S & Kobata A, 1984 44
Comparative study of the oligosaccharides released from BHK cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis
J. Biol. Chem. 259 : 10834-10840
- Yogeeswaran G & Salk P, 1981 45
Metastatic potential is positively correlated with cell-surface sialylation of cultured murine tumor cell lines
Science 212 : 1514-1516
- Yogeeswaran G, Stein BS & Sebastian H, 1978 45
Altered cell surface organization of gangliosides and sialyl glycoproteins of mouse metastatic melanoma variant lines selected *in vivo* for enhanced lung colonization
Cancer Res. 38 : 1336-1344
- Zavada J & MacPherson I, 1970 48
Transformation of Hamster cell lines *in vitro* by a Hamster sarcoma virus
Nature 225 : 24-26



RESUME

Les glycanes des glycoconjugués cellulaires sont modifiés lors de la transformation maligne. Ils subissent notamment une multi-antennarisation et une hypersialylation, reflète du dérèglement d'activités glycosyltransférasiques.

Dans le but d'établir une corrélation entre la malignité et les modifications de la structure des glycanes, nous avons transformé *in vitro* deux lignées fibroblastiques (BHK 21/C13 et NIH 3T3), par transfection de l'oncogène *c-Ha-ras* humain. L'analyse génomique des clones obtenus a confirmé la présence de l'oncogène. Les cellules ainsi transformées sont tumorigènes *in vivo*, ce qui permet d'isoler des clones tumoraux et des clones de cellules de métastases pulmonaires.

Nous avons évalué les modifications de la glycosylation de ces cellules. La comparaison des activités sialyltransférasiques *in vitro* a permis de détecter une augmentation significative de transfert chez les cellules transformées, accompagnant le degré de malignité. L'analyse comparée des glycopeptides membranaires des cellules normales et transformées, effectuée par tamisage moléculaire et chromatographie d'affinité sur des lectines immobilisées, montre une augmentation de la proportion de structures de type N-acétyllactosaminique tri- et/ou tétra-antennées. Ces résultats permettent d'établir une corrélation entre la transformation cellulaire par un seul gène transformant et la malignité qui s'accompagne d'altérations de la glycosylation.

En vue d'obtenir les glycopeptides en quantité suffisante pour la détermination des structures glycaniques par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, nous avons mis au point un protocole de préparation de ces composés à partir de cellules cultivées en masse et transposé, à l'échelle préparative, le protocole de leur fractionnement fondé sur la chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées.