

N° d'ordre : 772

50376
1989
321

50376
1989
321

THÈSE

présentée à

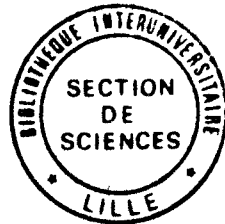
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Henri DEBRAY



CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MODIFICATIONS AFFECTANT LES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNNE DES CELLULES ET DE LA DIFFUSION METASTATIQUE

Présentée le 10 Février 1989 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :	J. MONTREUIL
Rapporteurs :	M. MONSIGNY G. REBEL
Examineurs :	G. SPIK G. STRECKER

* * *

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

* * *

* *
* *

TABLE DES MATIERES

* *
* *

INTRODUCTION	P. 1
GENERALITES	7
CHAPITRE I : <u>LES GLYCOCONJUGUES DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	7
I) <u>INTEGRATION DES GLYCOCONJUGUES DANS L'ORGANISATION</u> <u>DE LA MEMBRANE CELLULAIRE</u>	8
A) LOCALISATION DES GLYCOCONJUGUES DE LA MEMBRANE DE SURFACE	8
1) Les glycoprotéines membranaires	10
2) Les glycosphingolipides	16
B) LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	18
II) <u>STRUCTURES ET CONFORMATIONS DES GLYCANNES DES</u> <u>GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES</u>	20
A) LES O-GLYCOSYLPROTEINES	22
1) Glycannes liés à la sérine (ou à la thréonine)	22
2) Glycannes liés à l'hydroxyproline ou à l'hydroxylysine	26
B) LES N-GLYCOSYLPROTEINES	26
1) Les glycannes de type oligomannosidique	28
2) Les glycannes de type N-acétyllactosaminique ..	30
3) Les glycannes de type mixte	33
C) CONFORMATION DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	33
D) IMPLICATIONS BIOLOGIQUES LIEES A LA CONFORMATION SPATIALE DES GLYCANNES	40
1) Interactions avec les lectines	40
2) Interactions avec les enzymes	40
3) Interactions entre les glycannes et les protéines	40

III) <u>ANTIGENICITE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES</u>	
<u>MEMBRANAIRES</u>	41
IV) <u>CONCLUSIONS</u>	44
CHAPITRE II : <u>ROLES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES</u>	
<u>MEMBRANAIRES</u>	46
I) <u>ROLES JOUES PAR LES GLYCANNES DANS LE METABOLISME</u>	
<u>CELLULAIRE</u>	47
A) STABILISATION DES MEMBRANES BIOLOGIQUES	47
B) CONTROLE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE	48
C) ROLE DES GLYCANNES DANS LA CONFORMATION DES GLYCOPRO- TEINES MEMBRANAIRES.....	49
D) ROLE PROTECTEUR DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES CONTRE LES ATTAQUES PROTEOLYTIQUES.....	49
II) <u>ROLES JOUES PAR LES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES</u>	
<u>MEMBRANAIRES DANS LA VIE SOCIALE DES CELLULES.....</u>	50
A) ROLE DES GLYCANNES DANS LES PHENOMENES DE RECONNAIS- SANCE ET D'ADHESION CELLULAIRE.....	50
1) Interaction ectoglycosyltransferase membranaire- glycanne (hypothèse de ROSEMAN).....	51
2) Interaction lectine membranaire-glycanne.....	51
3) Autres glycoprotéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire.....	57
B) ROLE DES GLYCANNES MEMBRANAIRES DANS LE PHENOMENE D'INHIBITION DE CONTACT.....	58
1) Participation des glycanes de type oligoman- nosidique des glycoprotéines membranaires dans l'inhibition de contact de croissance.....	58

2) Participation des glycannes des glycosphingolipides membranaires dans l'inhibition de contact de croissance.....	59
C) LES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES SONT DES RECEPTEURS DE MOLECULES SOLUBLES.....	60
III <u>CONCLUSIONS</u>	61
CHAPITRE III : <u>MODIFICATIONS DES GLYCOCONJUGUES DE LA SURFACE CELLULAIRE ASSOCIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE..</u>	62
I) <u>CONCEPT D'UNE GLYCOSYLATION ABERRANTE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES ET DES GLYCOPROTEINES ASSOCIEE A LA TRANSFORMATION MALIGNNE</u>	62
A) MODIFICATIONS DES GLYCANNES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES ASSOCIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE.....	63
1) Synthèse incomplète des glycannes avec ou sans accumulation de précurseur.....	63
2) Synthèse de glycolipides tumoraux.....	63
B) MODIFICATIONS DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES ASSOCIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE..	66
1) Synthèse modifiée des glycannes des N-glycosylprotéines membranaires.....	66
a) Modification quantitative affectant les glycannes de type N-acétyllactosaminique : la polyantennarisation des glycannes.....	66
b) Modifications quantitatives et qualitatives affectant les glycannes de type oligomannosidique.....	75
c) Modifications qualitatives affectant les glycannes de type N-acétyllactosaminique..	75

2) Modifications des séquences oligosaccharidiques périphériques des glycanes des glycoprotéines et des glycolipides associées à la transformation maligne.....	76
3) Modifications structurales affectant les glycanes des O-glycosylprotéines membranaires.....	81
II) <u>CONSEQUENCES BIOLOGIQUES POSSIBLES DES MODIFICATIONS DES GLYCOCONJUGUES DE LA SURFACE CELLULAIRE OBSERVEES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNNE.....</u>	82
A) MODIFICATIONS DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE.....	82
B) MODIFICATIONS DE L'ADHESIVITE CELLULAIRE.....	85
C) ABOLITION DES SYSTEMES DE CONTROLE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.....	87
D) PERTURBATION DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE ET DES TRANSPORTS ACTIFS.....	87
E) BOULEVERSEMENT DES SIGNAUX DE RECONNAISSANCE CONSTITUES PAR LES GLYCANNES DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES...	87
F) APPARITION OU REAPPARITION DE NOUVEAUX ANTIGENES GLYCANNIQUES MEMBRANAIRES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNNE.....	88
III <u>CONCLUSIONS.....</u>	88

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIELS ET METHODES

I) <u>MODELES EXPERIMENTAUX ETUDIES</u>	90
A) MEMBRANES PLASMIQUES ISOLEES DE FOIE DE RAT NORMAL ET HEPATOMATEUX.....	90
B) FIBROBLASTES DE REIN DE HAMSTER NORMAUX OU TRANSFORMES PAR LE VIRUS DU SARCOME DU HAMSTER.....	92
C) CELLULES UROEPITHELIALES HUMAINES NORMALES ET CANCEREUSES.....	94
D) CELLULES DU CARCINOME PULMONAIRE MURIN DE LEWIS (CELLULES LL ₂) A HAUT ET A FAIBLE POUVOIR METASTATIQUE.....	94
II) <u>UTILISATION DES LECTINES DANS L'ETUDE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES</u>	113
A) SPECIFICITE DES LECTINES EN SOLUTION.....	113
B) SPECIFICITE DES LECTINES IMMOBILISEES.....	131
III) <u>PROCEDE GENERAL DE FRACTIONNEMENT ET D'ETUDE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES</u>	219
A) DELIPIDATION DES MEMBRANES PLASMIQUES OU DES CELLULES ENTIERES.....	219
B) HYDROLYSE PRONASIQUE EXHAUSTIVE DU MATERIEL CELLULAIRE DELIPIDE.....	219
C) CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE DES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES.....	219

D) FRACTIONNEMENT DES N-GLYCOSYLPEPTIDES.....	220
1) Par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées.....	220
2) Par chromatographie liquide de haute performance (HPLC).....	221
E) ETUDE DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON DES GLYCOPEPTIDES OU GLYCANNES MEMBRANAIRES.....	224

APPLICATION DU PROCEDE GENERAL DE FRACTIONNEMENT A L'ETUDE
DES MODIFICATIONS AFFECTANT LES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES
MEMBRANAIRES LORS DE LA TRANSFORMATION MALIGNES DES CELLULES ET DE LA
DIFFUSION METASTATIQUE.

I) <u>STRUCTURES DES GLYCANNES DES MEMBRANES PLASMIQUES DE FOIE DE RAT NORMAL ET HEPATOMATEUX.....</u>	226
II) <u>ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES DE FIBROBLASTES DE REIN DE HAMSTER NORMAUX (BHK21/C13/8) ET TRANSFORMES PAR LE VIRUS DU SARCOME DU HAMSTER (BHK 21/C13/8/HS 5).....</u>	234
A) ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES MEMBRANAIRES TOTAUX....	234
B) ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES DES FIBRONECTINES SECRETEES PAR LES DEUX TYPES CELLULAIRES.....	272
III) <u>ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES DE CELLULES URO-EPITHELIALES HUMAINES NORMALES ET CANCEREUSES.....</u>	282
IV) <u>ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES MEMBRANAIRES DE CELLULES DU CARCINOME PULMONAIRE MURIN DE LEWIS (LL₂) POSSEDANT DES POUVOIRS METASTATIQUES DIFFERENTS.....</u>	289
CONCLUSIONS GENERALES.....	309

* * *

INTRODUCTION

* * *

Les recherches menées depuis 15 ans sur les glycoconjugués ont clairement démontré l'importance de ces molécules dans la biologie et la physiologie cellulaire. Ces glycoconjugués sont impliqués dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires, dans le contrôle de la perméabilité membranaire et en tant que déterminants antigéniques de la cellule.

La transformation maligne va s'accompagner de nombreux désordres, en particulier de la vie sociale des cellules. On voit donc que la connaissance de la structure des glycannes de ces glycoconjugués en général et des glycoprotéines membranaires, en particulier, ainsi que celle de leur conformation est indispensable pour mieux comprendre leur rôle. D'autre part, afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications de ces structures glycaniques dans les cellules cancéreuses, il nous fallait disposer de méthodes miniaturisées de fractionnement des glycannes membranaires, faisant notamment appel à la chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées.

Après avoir rappelé l'état actuel de nos connaissances sur la structure, le rôle des glycannes des glycoprotéines membranaires ainsi que les modifications structurales qui les affectent lors de la transformation maligne, nous décrirons la mise au point d'un procédé général de fractionnement et d'étude des glycannes membranaires ainsi que son application à l'étude des modifications structurales affectant les glycannes lors de la transformation maligne et du processus de diffusion métastatique.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre général des recherches sur les relations structure-fonction des constituants membranaires réalisées dans l'Unité Associée au CNRS N°217.

Ils ont fait l'objet des mémoires, actes de congrès et revues générales suivants.

MEMOIRES

1. H. DEBRAY, B. FOURNET, J. MONTREUIL, L. DORLAND et J.F.G. VLIEGENTHART.
Structure determination by 360-MHz ^1H -NMR spectroscopy and methylation analysis of a biantennary glycan of the N-acetyllactosaminic type isolated from rat liver plasma membrane.
Eur. J. Biochem. (1981), 115, 559-563.
2. H. DEBRAY, D. DECOUT, G. STRECKER, G. SPIK et J. MONTREUIL.
Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.
Eur. J. Biochem. (1981), 117, 41-55.
3. H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
Structural basis for the affinity of four insolubilized lectins, with a specificity for α -D-mannose, towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides.
J. Biosci. (1983), 5, suppl.1, 93-100.
4. M. VIAU, J. CONSTANS, H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
Isolation and characterization of the O-glycan chain of the human Vitamin D-binding protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983), 117, 324-331.
5. A. PIERCE-CRETEL, H. DEBRAY, J. MONTREUIL, G. SPIK, H. VAN HALBEEK, J.H.G.M. MUTSAERS et J.F.G. VLIEGENTHART.
Primary structure of N-glycosidically linked asialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk.
Eur. J. Biochem. (1984), 139, 337-349.
6. H. DEBRAY, G. STRECKER et J. MONTREUIL.
Effect of alkalis on N-glycosidic linkages of glycoproteins.
Biochem. Soc. Trans. (1984), 12, 611-612.

7. H. DEBRAY et P. ROUGE.
The fine sugar specificity of the Lathyrus ochrus seed lectin and isolectins.
FEBS Lett. (1984), 176, 120-124.
8. P. DELANNOY, H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation de cellules BHK 21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. Hypothèse concernant l'essaimage métastatique par masquage des sites lectiniques de la fibronectine.
C.R. Acad. Sci. Paris (1985), 301, 767-772.
9. B. SAMOR, J.C. MICHALSKI, H. DEBRAY, C. MAZURIER, M. GOUEMAND, H. VAN HALBEEK, J.F.G. VLIEGENTHART et J. MONTREUIL.
Primary structure of a new tetraantennary glycan of the N-acetylglucosaminic type isolated from human factor VIII/VON WILLEBRAND factor.
Eur. J. Biochem. (1986), 158, 295-298.
10. H. DEBRAY, Z. QIN, P. DELANNOY, J. MONTREUIL, D. DUS, C. RADZIKOWSKI, B. CHRISTENSEN et J. KIELER.
Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines.
Int. J. Cancer (1986)., 37, 607-611.
11. H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS et N. SHARON.
Affinity of four immobilized Erythrina lectins toward various N-linked glycopeptides and related oligosaccharides.
Carbohydr. Res. (1986), 151, 359-370.
12. H. DEBRAY, B. FOURNET, R.D. PORETZ et J. MONTREUIL.
Behavior of a typical plant glycopeptide from Sophora japonica agglutinin towards seven plant lectins.
FEBS Lett. (1987) (submitted for publication).

13. H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE et J. MONTREUIL.
Isolation and characterization of glycopeptides from normal and Virus-transformed baby hamster kidney fibroblasts.
Glycoconjugate J. (1987) (submitted for publication).
14. H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, B. SAMOR et J. MONTREUIL.
New informations on the fine specificity of immobilized Concanavalin A and Lens culinaris agglutinin toward N-glycosylpeptides.
FEBS Lett. (1987) (submitted for publication).
15. E. ZENTENO, H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
The sugar specificity of Machaerocereus eruca isolectins.
FEBS Lett. (1987) (submitted for publication).
16. H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
A new isolation procedure of the lectin from the mushroom Aleuria aurantia and further study of its specificity toward various glycopeptides and oligosaccharides.
Glycoconjugate J. (1987) (submitted for publication).
17. D. DUS, H. DEBRAY, L. STRZADALA, J. RAK, H. KUSNIERCZYK, J. MONTREUIL et C. RADZIKOWSKI.
Lectin-resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. I-selection and in vivo properties.
Invasion and metastasis (1987) (submitted for publication).
18. H. DEBRAY, D. DUS, P. HUESO, C. RADZIKOWSKI et J. MONTREUIL.
Lectin-resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. II-Altered glycosylation of membrane glycoproteins.
Invasion and metastasis (1987) (submitted for publication).

ACTES DE CONGRES

1. H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
Structural basis for the affinity of four insolubilized lectins,

- with a specificity for α -D-mannose, towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides.
In T.C. BØG-HANSEN, Lectins-Biology and Biochemistry, Clinical Biochemistry, DE GRUYTER, BERLIN, 1 (1981), 221-230.
2. H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK et J. MONTREUIL.
Affinity of ten insolubilized lectins towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides.
In T.C. BØG-HANSEN and G.A. SPENGLER, Lectins-Biology and Biochemistry, Clinical Biochemistry, DE GRUYTER, Berlin, 3, (1983), 335-350.
 3. J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE et P. DELANNOY.
Lectins as oligosaccharide receptors.
In H. HOPPER, W. REUTTER, F. GUDAT and E. KOTTGEN, Structural Carbohydrate in the liver, FALK Symposium N°34, MTP Press Ltd, LANCASTER, (1983), 239-258.
 4. H. DEBRAY et J. MONTREUIL.
Spécificité des interactions lectines-glycoconjugués.
In A. FAURE, C. DOINEL, J.F. STOLTZ, Technologies de purification des protéines, DPIC-INPL, Paris, (1985), 119-126.
 5. D. DUS, C. RADZIKOWSKI, H. DEBRAY, J. MONTREUIL, B. CHRISTENSEN et J. KIELER.
Lectin binding to non-malignant and malignant human uroepithelial cells in vitro.
In T.C. BØG-HANSEN and J. BREBOROWICZ, Lectins-Biology and Biochemistry, Clinical Biochemistry, DE GRUYTER, BERLIN, 4, (1985), 65-74.
 6. E. ZENTENO, H. DEBRAY, J. MONTREUIL et J.L. OCHOA.
The sugar specificity of Machaerocereus eruca isolectins.
In T.C. BØG-HANSEN and E. VAN DRIESSE, Lectins-Biology and Biochemistry, Clinical Biochemistry, DE GRUYTER, BERLIN, 5, (1986), 147-153.

REVUES GENERALES

1. H. DEBRAY.
Les glycoconjugués de la membrane de surface des cellules normales et cancéreuses.
Bull. Cancer (1979), 66, 353-372.

2. J. MONTREUIL, S. BOUQUELET, H. DEBRAY, B. FOURNET, G. SPIK et G. STRECKER.
Glycoproteins.
In M.F. CHAPLIN et J.F. KENNEDY, Carbohydrate analysis : a practical approach, IRL Press, Oxford-Washington D.C., Chapitre 5, (1986), pp 143-204.

Les travaux rapportés dans ce mémoire correspondent principalement aux publications 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17 et 18 ; aux actes de congrès 1 et 2 et à la revue générale 2.

* *

GENERALITES

* *

CHAPITRE I

LES GLYCOCONJUGUES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

La cellule, élément de base des organismes pluricellulaires, ne vit pas isolément. Les cellules sont en effet capables de s'associer en tissus, de se reconnaître entre elles, de se défendre contre des agresseurs tels que les virus. Ce sont là les manifestations d'une vie sociale, terme employé pour la première fois par KALCKAR [1], qui impliquent une participation de la surface cellulaire, car c'est par leur surface cellulaire que les cellules sont en relation avec le milieu extérieur.

La surface cellulaire va donc jouer un rôle primordial dans les interactions cellulaires et dans les réponses de ces cellules à des agents extérieurs tels que certaines drogues, des hormones, des toxines, des virus. Ces interactions entre cellules seront primordiales dans les phénomènes de morphogenèse et d'organogenèse ainsi que dans la régulation de la croissance cellulaire. Ainsi, les cellules cancéreuses se caractérisent par la perte de l'inhibition de contact, se multiplient de façon anarchique et sont capables d'envahir d'autres tissus par métastase (ABERCROMBIE et AMBROSE [2], EMMELOT [3], HUGHES [4]).

Depuis quelques années, de nombreux travaux ont démontré le rôle important des sucres présents à la surface des cellules dans leur comportement social. Il faut rappeler, à cet égard, les deux découvertes fondamentales faites au début des années 1960 et qui ont contribué au développement des recherches sur les glycoconjugués, en général, et sur les glycoconjugués membranaires en particulier, ainsi qu'à l'utilisation des lectines dans ces recherches. En 1960, NOWELL [5] démontre que les phytohémagglutinines de haricot sont mitogènes et induisent la transformation blastique des lymphocytes. En 1965, AUB [6] découvre que la lectine du germe de blé provoque l'agglutination des cellules malignes à une concentration beaucoup plus faible que celle nécessaire à l'agglutination de cellules normales. Cette observation fut d'ailleurs confirmée en 1967 par BURGER et GOLDBERG [7], puis par INBAR et SACHS [8].

Deux types de molécules présentes à la surface cellulaire et renfermant des sucres sont impliquées dans ces phénomènes. Il s'agit de lipides ou de protéines de la membrane, substitués par un certain nombre de résidus de sucres. On les désigne sous les noms de glycolipides et de glycoprotéines ou plus généralement sous le terme de glycoconjugués. Ces molécules sont en contact avec le milieu extracellulaire et vont représenter des récepteurs de virus, d'hormones, de toxines ou de bactéries.

Les monosaccharides constituant la copule glucidique de ces glycoconjugués sont au nombre de 7 : il s'agit du glucose, du galactose, du mannose, du fucose, du xylose, de la N-acétylglucosamine, de la N-acétylgalactosamine et de l'acide sialique. Le nombre de combinaisons possibles de ces différents sucres est considérable et peut constituer un des facteurs conférant à la surface d'une cellule sa spécificité. Les glycannes des glycoconjugués membranaires représentent 2 à 10 % du poids total des membranes (GUIDOTTI [9]). Cependant, les glycoconjugués les plus abondants sont les glycoprotéines membranaires, renfermant au moins 80 % des sucres membranaires totaux.

Des altérations au niveau des glycoconjugués membranaires se traduiraient par une incapacité de la cellule cancéreuse à répondre aux facteurs de régulation externe (LLOYD [10]) et, depuis plus de 20 ans, de nombreux travaux de recherches ont pour but d'étudier les modifications des glycoconjugués membranaires associées à la transformation maligne.

I - Intégration des glycoconjugués dans l'organisation de la membrane cellulaire.

A - Localisation des glycoconjugués de la membrane de surface.

Selon le modèle de la mosaïque fluide proposé en 1972 par SINGER et NICOLSON [11] (Fig. 1), la membrane de surface est constituée par une double couche de lipides, fluide et asymétrique, dans laquelle flottent les constituants protéiques et glycoprotéiniques ainsi que des glycosphingolipides.

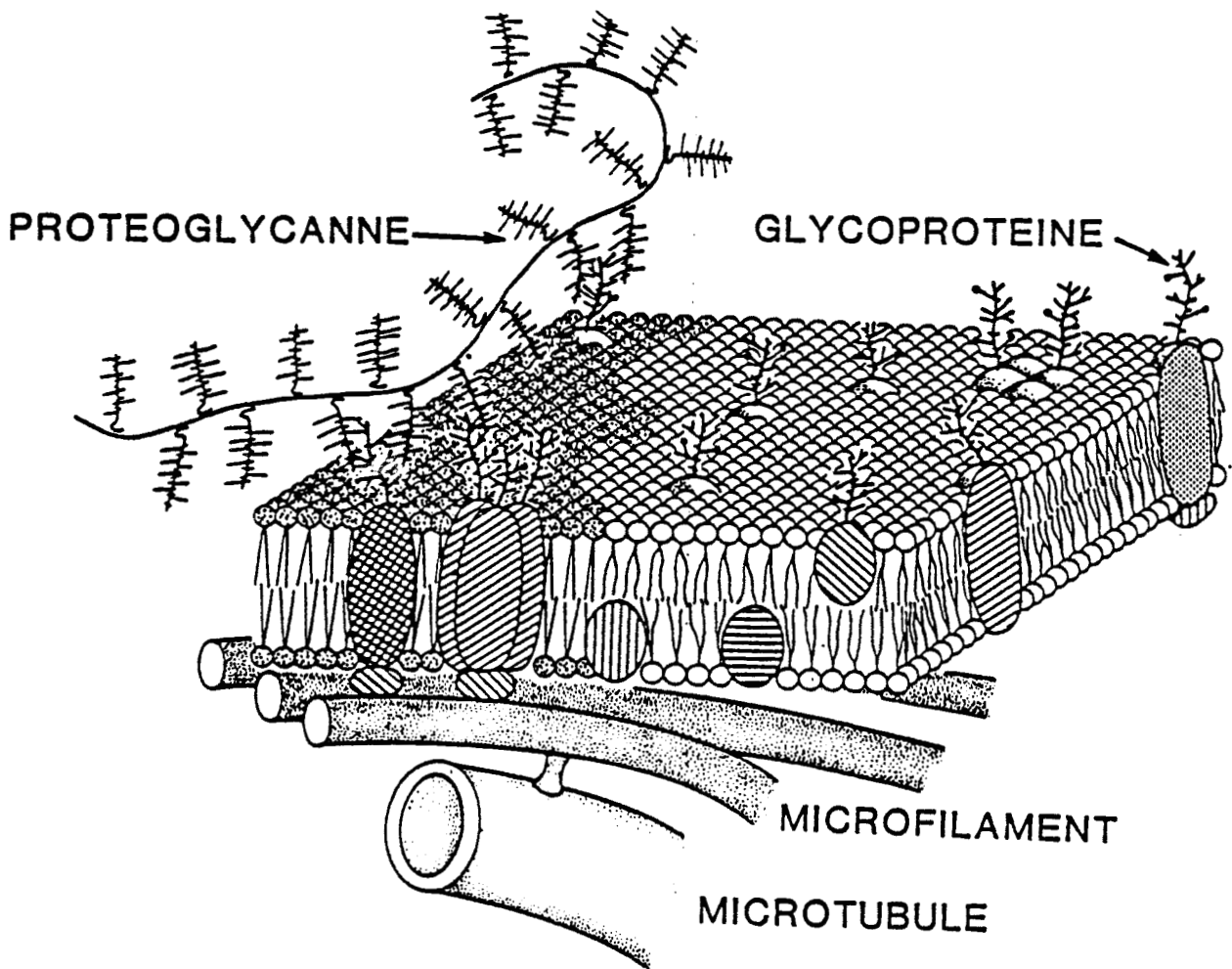


Fig. 1. Modèle de la structure membranaire en mosaïque fluide selon NICOLSON [12].

Les protéines ou glycoprotéines membranaires "flottent" dans une double couche de lipides bipolaires, les régions polaires des molécules lipidiques étant dirigées vers l'extérieur et les régions internes (filaments fins en forme de V aplati), constituées par les chaînes d'acides gras, dirigées vers la zone interne de la double couche lipidique.

Quelques microtubules et microfilaments, éléments contractiles de la cellule sont représentés sur ce schéma. Contrairement aux glycoprotéines ou aux protéines qui occupent ou traversent la double couche lipidique, ces microtubules appartiendraient aux constituants extrinsèques de la membrane.

Les glycoconjugués membranaires possèdent au moins deux régions fonctionnelles différentes : un domaine hydrophobe, intégré plus ou moins profondément dans la double couche lipidique et une région hydrophile, constituée par la copule glucidique, toujours située sur la face externe de la membrane.

De nombreuses techniques cytochimiques permettent de visualiser la localisation des sucres à la surface cellulaire. Ainsi, la figure 2 empruntée à BENEDETTI et EMMELOT [13] montre la coloration de membranes plasmiques isolées de foie de rat, par le réactif au fer colloïdal, qui réagit spécifiquement avec les résidus d'acide sialique chargés négativement. De même, l'utilisation de diverses lectines végétales en microscopie optique ou électronique (SCHREVEL et al. [14]) a permis de préciser l'orientation asymétrique des glycanes membranaires (Fig. 3). Il faut rappeler que dans le domaine de l'étude de la fluidité membranaire, les lectines rendues fluorescentes ou couplées à la ferritine induisent une redistribution remarquable des récepteurs membranaires à 37°C. Dans un premier stade, appelé "patching", on assiste à une condensation par petits amas des sites de fixation et à une disparition de la répartition uniforme. Puis, dans un deuxième temps, des calottes se forment en des points précis de la surface cellulaire : c'est le phénomène du "capping". Cette évolution démontre clairement que les glycoconjugués membranaires peuvent se déplacer dans le plan de la membrane. Ce phénomène est lié à la température et est en relation directe avec la fluidité des phases lipidiques membranaires (DE PETRIS [15]).

1 - Les protéines ou les glycoprotéines membranaires peuvent être de deux types :

- Tout d'abord, ce que SINGER et NICOLSON appellent les protéines ou les glycoprotéines intégrales, molécules dont la partie peptidique occupe ou traverse la double couche lipidique. Ces molécules ne peuvent être extraites de la membrane que par action d'agents tensio-actifs qui destabilisent les interactions hydrophobes existant entre certains domaines de la protéine et la région hydrophobe des lipides. Cependant, dans le cas de ces glycoprotéines intégrales, on remarque qu'une partie de la chaîne



Fig. 2. Mise en évidence des glycoconjugués de surface des membranes plasmiques isolées du foie de rat par le réactif à l'hydroxyde de fer colloïdal (selon BENEDETTI et EMMELOT [13]).

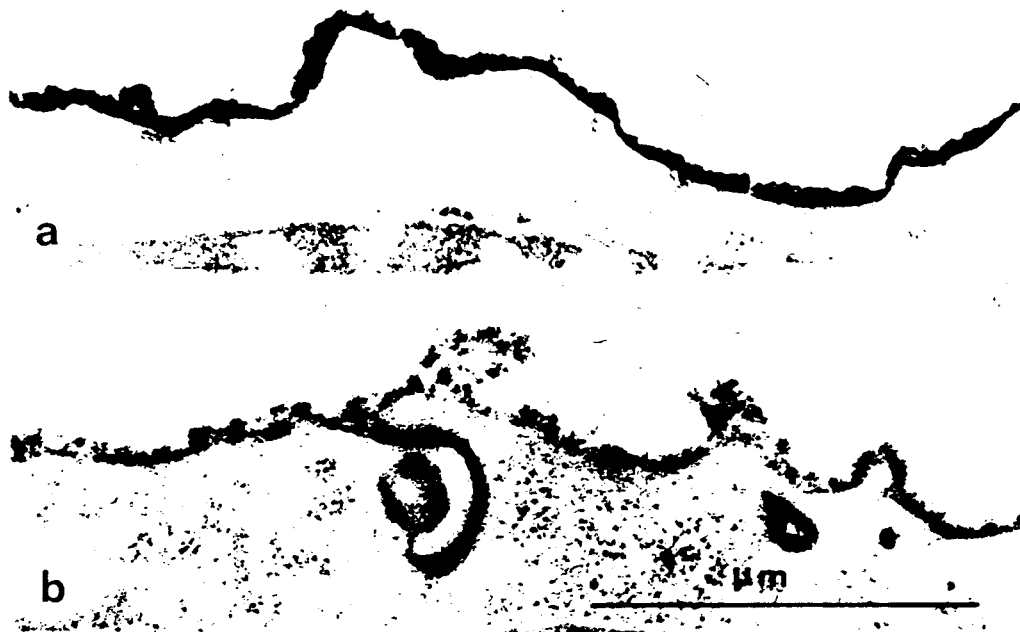


Fig. 3. Visualisation des glycoconjugués de la surface cellulaire à l'aide du complexe Concanavalline A-peroxydase de raifort révélé par la diaminobenzidine (TORPIER [16]).

a - Fibroblaste normal de rein de Hamster (BHK 21/C13/8).

b - Fibroblaste de rein de Hamster transformé par le virus du Sarcome du Hamster (BHK 21/C13/8/HS 5).

polypeptidique, généralement la région NH₂-terminale, glycosylée est dirigée vers le milieu extracellulaire. ROTHMAN et LENARD [17] proposent d'ailleurs une distinction entre deux types de protéines intégrales (Fig. 4) :

- Les ectoprotéines, glycoprotéines très hydrophiles, localisées sur la face externe de la cellule. A cette classe appartiendraient la glycophorine A, glycoprotéine majeure de la membrane du globule rouge et les antigènes d'histocompatibilité.
- Les endoprotéines, protéines intégrales associées à la face cytoplasmique de la membrane.

D'autres protéines ou glycoprotéines membranaires interagissent avec la région polaire des molécules lipidiques et pourront en être dissociées par augmentation de la force ionique ou du pH de milieu. Il s'agit des constituants extrinsèques ou périphériques de la membrane, en particulier des protéines du système contractile de la cellule (BENNET [18]).

Il faut enfin signaler que de nombreuses protéines et glycoprotéines membranaires sont ancrées dans le feuillet phospholipidique externe par l'intermédiaire de la partie 1, 2 - diacylglycérol d'une molécule de phosphatidylinositol liée de façon covalente à l'extrémité COOH - terminale de la glycoprotéine (LOW et al. [19]) comme le montre la figure 5. La glycoprotéine Thy-1 des membranes de thymocytes ou de neurones (LOW et KINCADE [20]), la phosphatase alcaline de membranes de cellules hépatiques ou rénales (LOW et FINEAN [21]) l'acétylcholinestérase de la membrane de l'érythrocyte ainsi peut-être que certaines formes de fibronectines membranaires (LANGE-MUTSCHLER [22]) sont insérées dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de ce type d'ancrage et peuvent être libérées par action d'une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol. Ce mode d'ancrage semble également répandu au niveau des glycoprotéines membranaires de Protozoaires parasites tel que *Trypanosoma brucei* (FERGUSON et al. [23]) et, à cet égard, ASHALL [24] a récemment établi un parallèle entre ces parasites et les cellules cancéreuses, tous les deux étant capables de se dépouiller de certains antigènes de surface de façon à leurrer les systèmes immunitaires de l'hôte et à échapper ainsi à la destruction. Il faut, d'autre part, remarquer que la fixation de diverses hormones,

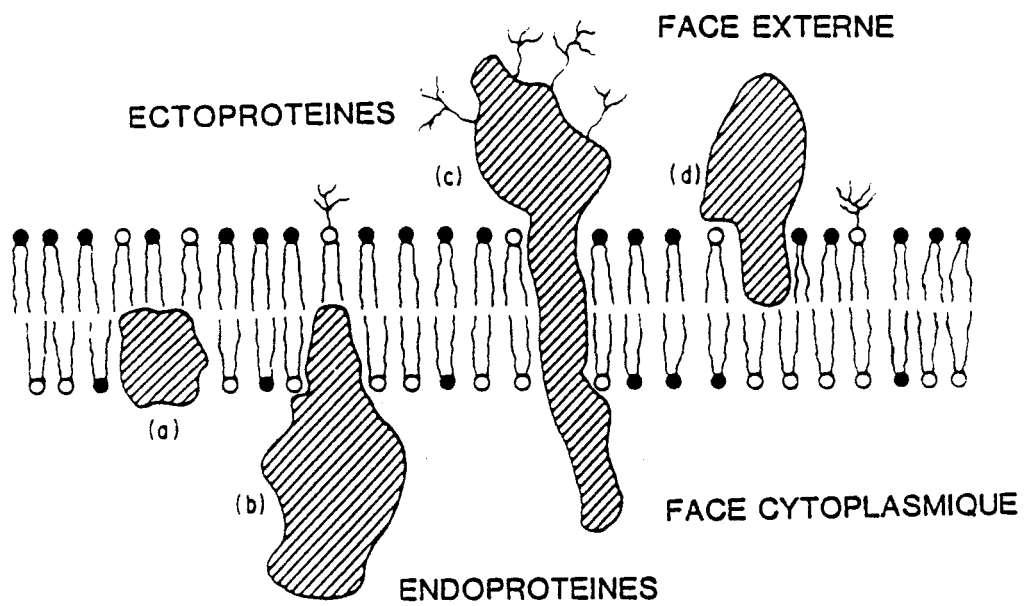


Fig. 4. Disposition dans la membrane des ectoprotéines (c et d) et des endoprotéines (a et b) selon ROTHMAN et LENARD [17].

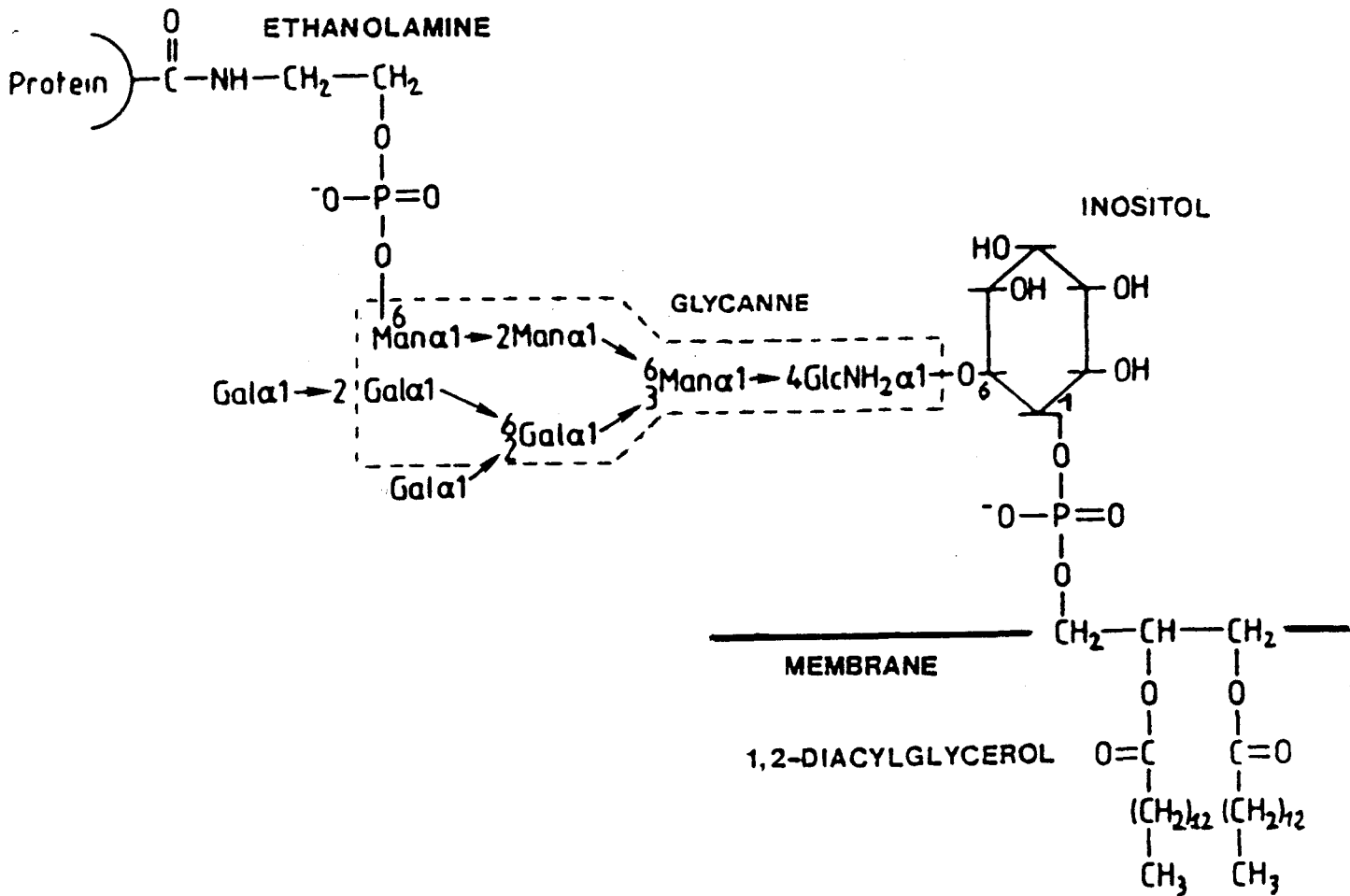


Fig. 5. Ancrage membranaire de certaines glycoprotéines par l'intermédiaire de la partie 1,2-diacylglycérol d'une molécule de phosphatidylinositol liée de façon covalente à l'extrémité terminale de la glycoprotéine (LOW et al. [19]).

de neurotransmetteurs ou de facteurs de croissance sur leurs récepteurs spécifiques à la surface cellulaire, se traduit par l'accélération du métabolisme des phospholipides contenant de l'inositol (BERRIDGE et IRVINE [25]). L'hydrolyse de ces phospholipides par une phospholipase C entraîne l'apparition de deux molécules, véritables seconds messagers : l'inositol - 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) qui libère le Ca^{++} depuis les "pools" intracellulaires et le 1,2-diacylglycérol qui induit la phosphorylation de protéines cytosoliques par activation de la protéine kinase C.

Ces phospholipides sont localisés dans le demi-feuillet interne de la membrane plasmique. Le plus abondant est le phosphatidylinositol (PI). Deux autres phospholipides, le phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP) et le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP_2) résultent de la phosphorylation séquentielle de l'inositol en position 4 et 5 par deux kinases spécifiques. Cependant, il semble peu probable que la phosphatidylinositol phospholipase C impliquée dans l'hydrolyse de ces phosphatidylinositols sur la face cytoplasmique de la membrane puisse également hydrolyser les résidus de phosphatidylinositol impliqués dans l'ancrage de ces glycoprotéines membranaires sur la face externe. Cependant, le 1,2-diacylglycérol libéré au cours d'une telle hydrolyse pourrait provoquer l'activation de la protéine kinase C (MAJERUS et al. [26]). Ces phosphatidylinositols sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire ; des perturbations au niveau du système de messagers constitué par ces lipoinositols pourraient être responsables de la croissance anarchique des cellules transformées (MAJERUS et al. [27]).

2 - Les glycosphingolipides (glycolipides) sont localisés presque exclusivement sur la face externe de la membrane plasmique. Ce sont des dérivés de la sphingosine comme le montre la figure 6. Cette base est substituée par un résidu d'acide gras et par des molécules de sucres. Ces molécules amphipathiques possèdent donc une région hydrophobe par lequel elles s'intègrent dans le feuillet lipidique hydrophobe externe et un pôle hydrophile dirigée vers le milieu extérieur (GAHMBERG et HAKOMORI [28], STECK et DAWSON [29]). Cette région polaire peut être plus ou moins complexe selon le nombre et la nature des substituants glucidiques (Fig. 6). Des descriptions détaillées des structures et du métabolisme de ces glycosphingolipides

N-Acyl-sphingosine
(céramide)

R=Acide gras

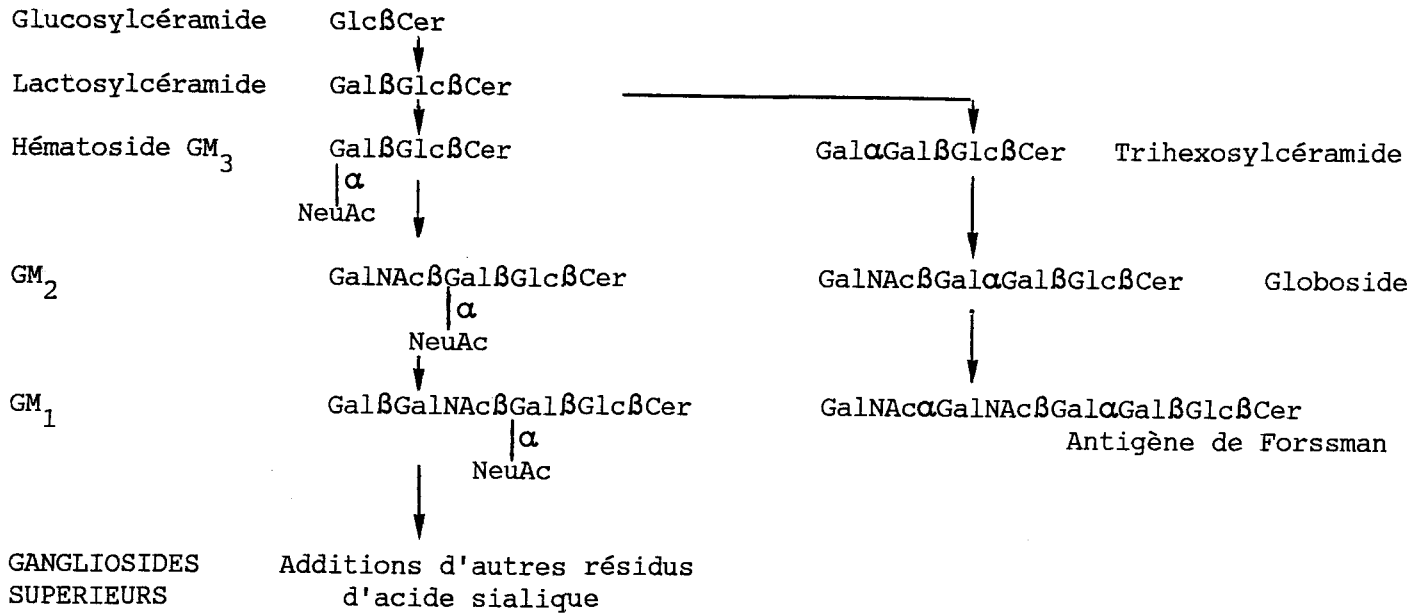
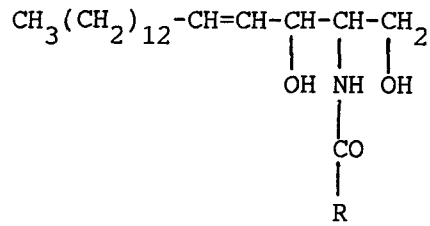


Fig. 6. Structure des glycosphingolipides, molécules amphipathiques de la membrane cellulaire. La région hydrophobe est constituée par la sphingosine substituée par un résidu d'acide gras. Cette N-acyl-sphingosine est appelée céramide et constitue la sous-unité de base, substituée par des chaînes glycaniques de complexité variable constituant la région polaire de ces glycosphingolipides.

Sur la figure sont également représentés des glycolipides renfermant un résidu d'acide sialique. Il s'agit des gangliosides allant des monosialyldihexosylcéramides ou GM_3 à des dérivés renfermant jusqu'à 4 résidus d'acide sialique. Il est intéressant de noter que ces dérivés di-, tri- ou tétrasialylés ne sont plus synthétisés par les cellules tumorales.

On notera également la complexité de la chaîne glycanique de FORSSMAN qui s'apparente à un nouvel antigène de groupe sanguin A réapparaissant dans les tissus cancéreux (selon HUGHES [4]).

et en particulier des gangliosides ont été publiées récemment (HAKOMORI et KANNAGI [30]) ainsi qu'une revue de THOMPSON et TILLACK précisant leur organisation dans les membranes plasmiques des cellules animales [31]. La concentration importante de ces glycosphingolipides dans le feuillet lipidique externe de la membrane confère à celle-ci une stabilité structurale accrue. Ainsi, des liposomes préparés à l'aide de phospholipides et de glycosphingolipides présentent une plus grande stabilité que des liposomes élaborés uniquement à l'aide de phospholipides (SHAROM et GRANT [32]).

Les glycanes de ces glycosphingolipides sont également impliqués dans les phénomènes d'interaction et de reconnaissance cellulaires ; ils représentent des déterminants antigéniques et des médiateurs de la réponse immune et sont des récepteurs de virus, d'hormones, de toxines, ou de lectines végétales. Ces glycosphingolipides vont subir de profondes modifications structurales au cours de la croissance, de la différenciation ou du vieillissement cellulaire ainsi que lors de la transformation maligne (HAKOMORI [33]).

B - La matrice cellulaire.

A côté des glycoprotéines et glycosphingolipides faisant partie intégrante de la membrane plasmique, la plupart des cellules possèdent une zone péricellulaire, d'épaisseur variable selon le type cellulaire (entre 10 et 20 nm), très riche en glycoconjugués. Autrefois, cette zone péricellulaire était appelée glycocalyx ou "cell-coat" (MARTINEZ-PALOMO [34]) ; on la désigne maintenant sous le nom de matrice extracellulaire. Dans les tissus, les cellules sont maintenues en contact étroit grâce à ces matrices extracellulaires élaborées par des cellules spécialisées (fibroblastes, chondroblastes). Au niveau des tissus conjonctifs, on trouve peu de cellules et une matrice extracellulaire abondante, alors que dans d'autres tissus tel que le tissu hépatique, ce compartiment extracellulaire est peu important.

Ces matrices extracellulaires sont très riches en collagènes, en protéoglycanes et en glycoprotéines de structure telles que la fibronectine ou la laminine (voir les revues générales de YAMADA et al. [35, 36] et de KLEINMAN et al. [37]). La figure 7 empruntée à APLIN et HUGHES [38] présente les relations existant entre cette

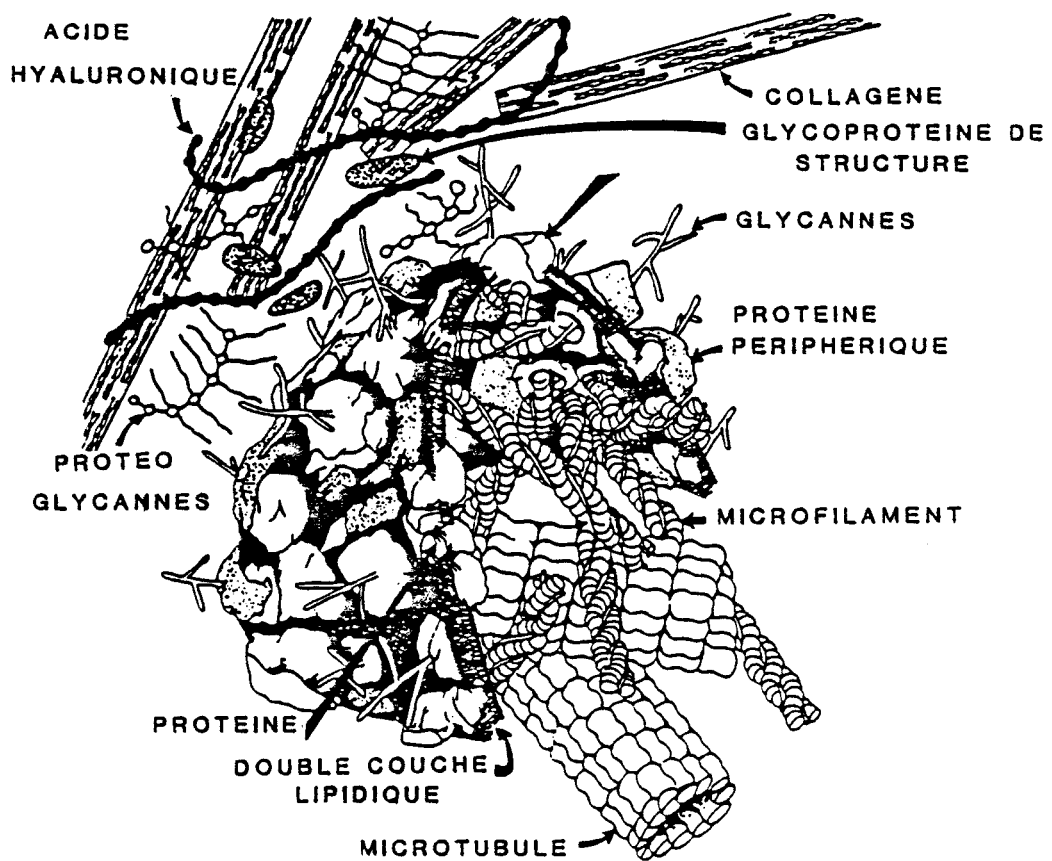


Fig. 7. Représentation des relations entre les constituants de la matrice extracellulaire, les glycoconjugués membranaires et les éléments du cytosquelette selon APLIN et HUGUES [38].

matrice extracellulaire, la membrane plasmique proprement dite et les éléments du cytosquelette.

Des travaux récents démontrent l'importance de ces matrices extracellulaires dans le contrôle de l'adhésion ou du comportement social des cellules (APLIN et HUGHES [38]). Nous terminerons en rappelant que les différentes glycoprotéines des membranes plasmiques ainsi d'ailleurs que les éléments du cytosquelette sous-jacent ou les macromolécules des matrices extracellulaires ne constituent pas un ensemble figé. Si les phospholipides et les glycosphingolipides peuvent pivoter sur eux-mêmes ou diffuser latéralement dans le plan de la membrane (BRETCHER et RAFF [39]), les protéines ou les glycoprotéines semblent moins mobiles ; cependant, des diffusions de certaines protéines dans la double couche lipidique ont été observées (FRYE et EDIDIN [40]), ces mouvements pouvant être contrôlés d'une part par les éléments du cytosquelette, mais également par les interactions de la partie externe de ces glycoprotéines avec les macromolécules de la matrice extracellulaire.

II - Structures et conformations des glycanes des glycoprotéines membranaires.

A cause des difficultés rencontrées au cours de leur isolement, on ne commence que depuis quelques années à connaître les structures de quelques glycanes de glycoprotéines membranaires.

Comme dans les glycoprotéines de sécrétion (voir les revues de STRECKER et MONTREUIL [41], KORNFELD et KORNFELD [42], MONTREUIL [43], KOBATA [44], KORNFELD et KORNFELD [45]), les glycoprotéines membranaires résultent de l'association covalente d'un glycanne avec une protéine.

D'une façon générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la liaison glycanne-protéine (Fig. 8). Les glycanes sont conjugués aux chaînes peptidiques par deux types de liaisons principales.

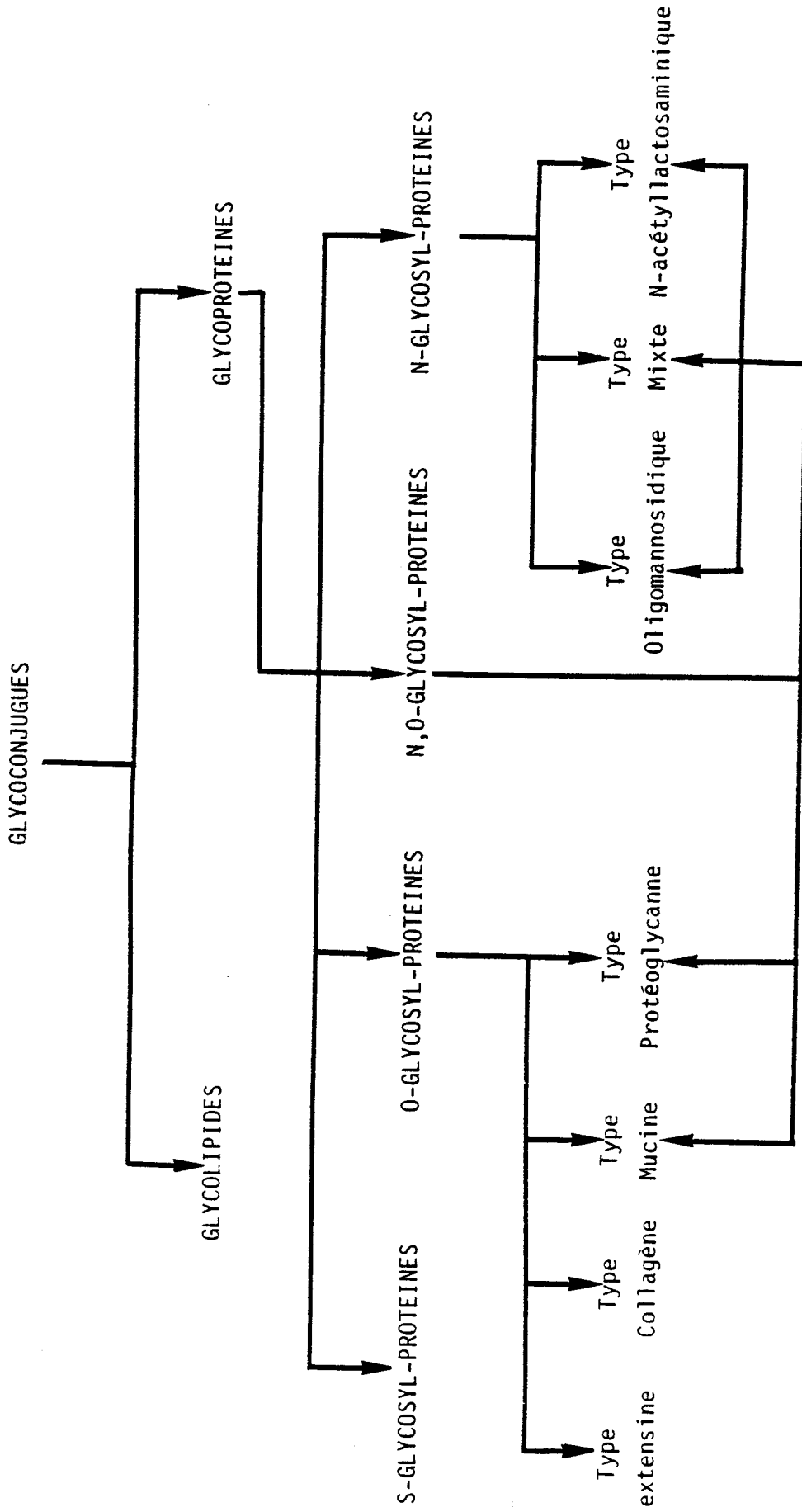


Fig. 8. Classification des glycoconjugués (MONTREUIL [43]).

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

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

A - Les O-glycosylprotéines.

Les O-glycosylprotéines résultent de la conjugaison, par une liaison O-glycosidique, d'un monosaccharide (la N-acétylgalactosamine, le xylose, le galactose, le mannose ou le fucose) à un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine, hydroxyproline, hydroxylysine ou tyrosine).

Deux sous-groupes peuvent être distingués en fonction de la nature de l'acide aminé impliqué dans la liaison glycanne-protéine ainsi que par leur stabilité en milieu alcalin : la liaison O-glycosidique est caractérisée par sa fragilité en milieu alcalin lorsque l'acide aminé impliqué est la sérine ou la thréonine, alors qu'elle est alcali-stable dans le cas de l'hydroxylysine et de l'hydroxyproline.

1 - Glycannes liés à la sérine (ou à la thréonine).

a - Liaison sérine (thréonine)-N-acétyl galactosamine.

Le plus souvent, dans ces glycannes liés O-glycosidiquement, on retrouve un noyau disaccharidique commun $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$ qui peut être substitué par différents motifs oligosaccharidiques. Quelques exemples de glycannes membranaires de type O-glycosidique sont présentés dans le Tableau I (p.23). Dans le cas des érythrocytes Tn réactifs (DAHR et al. [46]), la partie glycanne ne comporte que le seul résidu de N-acétylgalactosamine alors que le mégalosaccharide de substances de groupes sanguins décrit par KABAT (cf Tableau I) comporte une vingtaine de monosaccharides.

TABEAU I

Exemples de glycanes liés à la protéine par des liaisons
du type GalNAc(α-3)Ser(Thr)

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCE
GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes	DAHR
	Tn-réactifs	<u>et al.</u>
Gal(β1-3)GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes	[46]
	T-réactifs	-id-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes	TAKASAKI
	Type 0	<u>et al.</u>
		[47]
Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	-id-	-id-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Glycophorine humaine	THOMAS et
NeuAc(α2-6)	(groupe M)	WINZLER [48]
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Sialoglyco- protéine de	EDGE <u>et al.</u>
Neu(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	membrane d'erythrocyte de rat	[49]
	ou	
	Glycocalicine	TSUJI
	de plaquettes	<u>et al.</u>
	humaines	[50]
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3) GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Epiglycanine	VAN DEN
NeuAc(α2-6)	des cellules	EIJNDEN
	TA ₃ -Ha	<u>et al.</u>
		[51]
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc(α1-3)Ser(Thr)	Leucosialine	FUKUDA
NeuAc(α2-3)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) (0-3)	de granulo- cytes humains	<u>et al.</u> [52]
[Le ^b] (H) Fuc(α1-2) Gal(NAc)(α1-3) Gal(β1-3)GlcNAc(β1-4) Gal(β1-3)GlcNAc(β1-4) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Fuc(α1-2) Fuc(α1-3) [SSEA-1]		
	Mégalosaccha- ride de	KABAT
	substances	[53]
	de groupes sanguins	

Ces O-glycosylprotéines membranaires sont également appelées glycoprotéines de type mucine. L'exemple le plus caractéristique de ce type de O-glycoprotéines membranaires est constitué par l'épiglycanine, glycoprotéine de surface majeure des cellules TA₃-Ha, forme ascitique d'un carcinome mammaire de la Souris (CODINGTON [54]). Cette glycoprotéine représente 1 p. 100 du poids sec total de ces cellules, renferme 75 à 80 p. 100 de sucres, a un poids moléculaire de 500 000 et se présente sous la forme de bâtonnets de 450 à 500 nm de long, étroitement entassés à la surface cellulaire. Les cellules TA₃-Ha peuvent être transplantées chez une autre souche de souris alors qu'une autre lignée cellulaire du même carcinome (cellules TA₃-St) ne possède pas d'épiglycanine et ne peut être transplantée qu'à des souris syngéniques. Ceci démontre le rôle de cette glycoprotéine dans le "camouflage" des antigènes d'histocompatibilité H-2 responsables de ce phénomène de rejet chez les cellules TA₃-St (CODINGTON et al. [55]).

b - Liaison sérine (thréonine)-xylose.

Ce type de liaison Xyl(β 1-3)Ser se rencontre dans les protéoglycannes des matrices extracellulaires tels que l'héparine, l'héparane sulfate, les chondroïtines sulfates ou le dermatane sulfate (Voir à ce sujet la revue de RODEN [56]).

c - Liaison sérine (thréonine)-mannose.

Récemment, des glycannes liés par l'intermédiaire d'une liaison D-mannosyl-O-sérine (ou thréonine) ont été libérés par β -élimination en milieu réducteur et caractérisés dans un chondroïtine sulfate de cerveau de Rat (FINNE et al. [57], KRUSIUS et al. [58]). La figure 9 présente la structure de ces glycannes. Ce type de liaison semble également présent dans les mannoprotéines de la paroi de certaines levures (BALLOU et al. [59]).

d - Autres types de liaison.

D'autres monosaccharides peuvent assurer la liaison avec la sérine. SPIRO et BHOYROO ont décrit une liaison Gal(α 1-3)Ser(Thr) dans le collagène de cuticule de Nereis [60]. LARRIBA, dans certains tissus de Rat [61] et STEINER et al., dans des lignées cellulaires normales

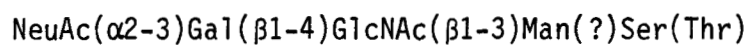
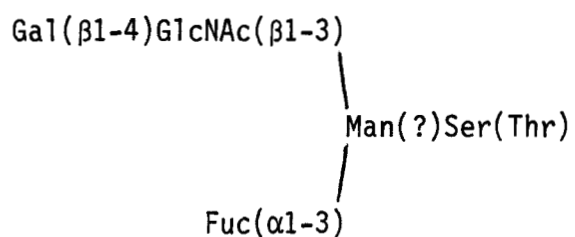
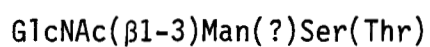


Fig. 9. Glycannes liés O-glycosidiquement à la sérine (ou à la thréonine) caractérisés dans le chondroïtine sulfate de cerveau de rat (FINNE et al. [57], KRUSIUS et al. [58]).

ou transformées [62] ont mis en évidence une liaison O-glycosidique Fuc(α 1-3)Ser(Thr). Enfin, récemment, TORRES et al. [63] et HOLT et HART [64] ont décrit, dans diverses glycoprotéines membranaires de foie de rat, l'existence de résidus de N-acétylglucosamine liés O-glycosidiquement principalement à la sérine et à un degré moindre à la thréonine.

2 - Glycannes liés à l'hydroxyproline ou à l'hydroxylysine.

La liaison Gal(β 1-5)Hyl a été mise en évidence par BUTLER et CUNNINGHAM [65] dans le tropocollagène de peau de cobaye et par SPIRO [66] dans les membranes basales des glomérules rénaux. Les chaînes oligosaccharidiques sont généralement constituées par le disaccharide Glc(α 1-2)Gal. Il faut signaler que ce type de liaison Gal(β 1-5)Hyl est très stable en milieu alcalin.

B - Les N-glycosylprotéines.

La seule liaison de type N-glycosidique présente dans les N-glycosylprotéines membranaires et certains protéoglycannes tels que les kératanes sulfates, résulte de la condensation de la N-acétylglucosamine et de l'asparagine en une glycosylamine. Cette liaison se caractérise par sa plus grande stabilité en milieu alcalin comparée à celle de la liaison de type O-glycosidique.

De nombreuses structures établies de glycannes liés N-glycosidiquement concernent des glycoprotéines sériques (voir la revue générale de MONTREUIL [67]). Ce n'est que plus récemment que des structures de glycannes membranaires liés N-glycosidiquement ont pu être déterminées, mettant en évidence de nombreuses similitudes entre les deux types de glycoprotéines.

Tous ces glycannes de type N-glycosidique possèdent un noyau pentasaccharidique commun : le mannotriosido-di-N-acétyl-chitobiose lié à un résidu d'asparagine de la protéine, présenté sur la figure 10 (p.27).

Cette structure pentasaccharidique commune ou fraction invariable (inv) (MONTREUIL [67]), placée en position interne ("inner-core") est substituée par des motifs oligosaccharidiques variables (fractions var).

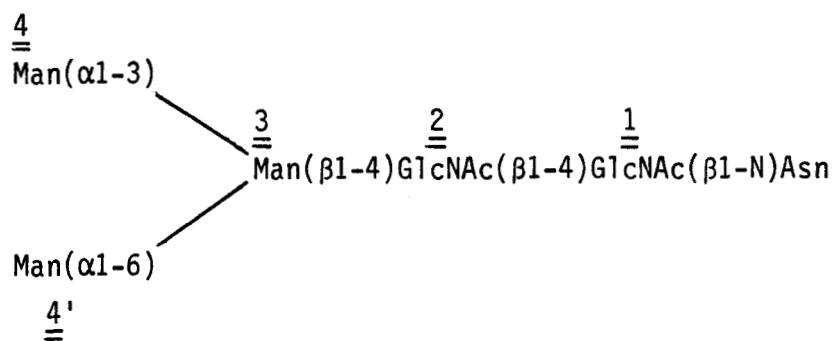


Fig. 10. Noyau invariable trimannosyl-N, N'-diacétyl-chitobiose commun aux glycanes de N-glycosylprotéines (MONTREUIL [67]).

On peut ainsi distinguer trois types de glycanes (MONTREUIL [43, 67]).

1 - le type oligomannosidique ("high-mannose" glycans) lorsque le noyau pentasaccharidique n'est substitué que par des résidus d' α -mannose.

2 - le type N-acétyllactosaminique ("complex type" glycans) lorsque ce noyau pentasaccharidique est substitué par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine, de galactose, de fucose, d'acides sialiques et parfois de N-acétylgalactosamine.

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

1 - Les glycanes de type oligomannosidique.

Dans ce groupe, le noyau pentasaccharidique est substitué par un nombre variable de résidus d' α -mannose. Les glycanes ainsi formés renferment, chez les Mammifères, au moins cinq résidus de mannose et, au plus, neuf résidus de mannose. Des glycanes à 6, 7 ou 8 résidus de mannose ont également été caractérisés.

Le Tableau II (p.29) présente différents glycanes de type oligomannosidique de glycoprotéines membranaires. Il faut signaler que des glycanes ne possédant que 3 ou 4 résidus de mannose ont été trouvés chez les Oiseaux. Au contraire, des structures plus complexes existent dans des mannoprotéines de Saccharomyces cerevisiae (BALLOU [68]).

Lors de la biosynthèse des glycanes liés N-glycosidiquement (voir sur ce sujet les revues de HUBBARD et IVATT [69], BEYER et al. [70], MONTREUIL [43] et KORNFELD et KORNFELD [45]), le précurseur oligosaccharidique commun est constitué par le motif $(\text{Man})_9 (\text{GlcNac})_2$ substitué par la séquence trisaccharidique $\text{Glc}(\alpha 1-2)\text{Glc}(\alpha 1-3)\text{Glc}(\alpha 1-3)$, glycanne que l'on retrouve dans une glycoprotéine membranaire de larve de Moustique (71) (voir Tableau II, p.29).

TABLEAU II

Glycannes de type oligomannosidique associés à des glycoprotéines membranaires

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCE
$ \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \end{array} $	Fibroblastes Ricine-résistants de rein de Hamster (cellules BHK)	HUGHES et FEENEY [72]
$ \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \end{array} $	Glycoprotéine de l'enveloppe du virus de sindbis	HAKIMI et al [73]
$ \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \end{array} $	Cellules ovariennes de Hamster chinois	Li et KORNFIELD [74]
$ \begin{array}{l} \text{Glc}(\alpha 1-2)\text{Glc}(\alpha 1-2)\text{Glc}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \end{array} $	Glycoprotéine membranaire de la larve du moustique <i>Aedes aegyptii</i>	BUTTERS et HUGHES [71]

2 - Les glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Dans cette deuxième classe de glycanes de type N-glycosidique, les deux résidus d' α -mannose du noyau pentasaccharidique sont substitués par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine, conduisant aux glycanes mono-, bi-, tri-, tetra-, penta- et hexa-antennés (MONTREUIL [43]). A cette variabilité liée au nombre d'antennes peuvent venir s'ajouter d'autres types de microhétérogénéité.

a - Les différents résidus de N-acétyllactosamine peuvent être substitués par des résidus d'acides sialiques ou de fucose :

NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc (β 1-)
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-)
Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-) déterminant antigénique SSEA-1 (HOUNSELL et al. [75]),

ou de façon moins fréquente par des résidus de fucose liés en (α 1-2), de galactose et de N-acétylgalactosamine :

Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant de groupe H (RAUVALA et FINNE [76]),

Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) (STRECKER et al. [77]),

Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant de groupe B (BLAKE et GOLDSTEIN [78], DORLAND et al. [79]),

Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant P1 (FRANCOIS-GERARD et al. [80]),

GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant de groupe A (RAUVALA et FINNE [76]),

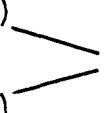
GalNAc(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant Sda (DONALD et al. [81]).

b - Une ou plusieurs antennes peuvent être substituées par un ou plusieurs résidus de N-acétyllactosamine supplémentaires, reliés entre eux :

- soit par des liaisons (β 1-3) pour donner un glycanne poly-(N-acétyllactosaminique) linéaire :

Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant antigénique i (WOOD et FEIZI [82]),

- soit par des liaisons (β 1-3) et (β 1-6) pour donner des glycannes poly-(N-acétyllactosaminiques) branchés :

Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)  Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-) déterminant antigénique I (WOOD et FEIZI [82]).

Ces glycannes poly-(N-acétyllactosaminiques) linéaires ou branchés peuvent également être substitués, comme précédemment, par des résidus de fucose, de galactose, etc....et posséder ainsi des activités de groupe ABH (KRUSIUS et al. [83]).

c - Un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire ("bisecting" N-acetylglucosamine) peut substituer en (β 1-4) le résidu de β -mannose de glycannes biantennés (YOSHIMA et al. [84]) ou multi-antennés (FRANCOIS-GERARD et al. [80]).

d - Le résidu de N-acétylglucosamine 1 impliquée dans la liaison N-glycosylamine peut être substitué par un résidu de fucose lié en (α 1-6) (SPIK et al. [85], DORLAND et al. [79]).

Le Tableau III (p.32) rassemble quelques exemples de glycannes de type N-acétyllactosaminique de glycoprotéines membranaires. L'exemple le plus caractéristique de glycoprotéine membranaire renfermant ce type de glycanne, ainsi d'ailleurs que de nombreux glycannes liés O-glycosidiquement (il s'agit à ce titre d'une O,N-glycosylprotéine) est constitué par la glycophorine A (FURTHMAYR [91]), glycoprotéine majeure de la membrane du globule rouge.

Elle possède un poids moléculaire de 31 000, renferme 60 p. 100 de sucres et est particulièrement riche en acide sialique (25 p. 100). La glycophorine, comme de nombreuses autres glycoprotéines membranaires est une molécule amphipathique (Fig. 11) : la région NH₂-terminale hydrophile et externe de la molécule est constituée de 70 acides aminés polaires et renferme 15 glycannes liés O-glycosidiquement (Tableau I, p.23) pour un seul glycanne lié N-glycosidiquement (Tableau III, p.32). Puis, l'on rencontre un second domaine de 23 acides aminés à caractère hydrophobe qui permet à la glycophorine de s'ancrer dans la double couche lipidique hydrophobe de la membrane. Enfin, la région COOH-terminale est également riche en acides aminés polaires et émerge de la face cytoplasmique de la membrane.

3 - Les glycannes de type mixte.

Dans ce type de glycannes, le noyau pentasaccharidique est substitué à la fois par des résidus d' α -mannose sur le mannose 4' et par un résidu de N-acétyllactosamine sur le mannose 4. Ce type de glycannes a été caractérisé dans différentes glycoprotéines membranaires (Tableau IV, p.35).

C - Conformation des glycannes des glycoprotéines membranaires.

Cette revue démontre la très grande diversité des structures glycaniques pouvant exister à la surface cellulaire et avant d'essayer d'attribuer à ces glycannes des fonctions spécifiques, il faut s'imaginer qu'à la surface cellulaire, chaque glycanne peut adopter une conformation tridimensionnelle caractéristique, permettant ainsi d'expliquer pourquoi ces molécules vont constituer à la fois des signaux de reconnaissance ou des récepteurs membranaires spécifiques.

La première conformation spatiale du glycanne de type N-acétyllactosaminique biantenné de la sérotransferrine humaine, élaborée à l'aide de modèles moléculaires et tenant compte de la réalité des ponts hydrogènes fut proposée, en 1975, par MONTREUIL [67]. Il s'agit de la conformation en Y (Fig. 12 a) où le noyau pentasaccharidique

apparaît comme une structure rigide sur laquelle viennent s'articuler les deux antennes constituées par les deux trisaccharides NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2). Puis, en 1978, à la suite d'études de diffraction des rayons X, faisant apparaître une disposition du résidu (α 1-3) mannose perpendiculaire par rapport au plan rigide défini par le trisaccharide Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc, la conformation en T fut proposée (Fig. 12 b) (MONTREUIL et al. [94]). Plus récemment, sur la base d'études physiques (DOUY et al. [95]) et de simulations par ordinateur (LI et al. [96], PEREZ, WARIN et MONTREUIL (cité in MONTREUIL, Réf. 43), la conformation dite en oiseau ("bird-conformation") fut proposée (Fig. 12 c) (MONTREUIL [97]). Ce modèle traduit une plus grande flexibilité des antennes autour des liaisons (α 1-6) par rapport à l'orientation figée imposée par les liaisons (α 1-3).

Enfin, sur la base de données obtenues par résonance magnétique nucléaire du proton (BRISSON et CARVER [98, 99]), la conformation dite "en aile brisée" ("broken wing-conformation") fut proposée (Fig. 12 d) (MONTREUIL [100]). Elle traduit l'un des deux repliements possibles de l'antenne liée en (α 1-6) le long du trisaccharide rigide Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc. Cette conformation est favorisée par la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire substituant en (β 1-4) le résidu de β -mannose (BRISSON et CARVER [99]).

Egalement sur la base de données obtenues par du proton ($^1\text{H-RMN}$), VLIEGENTHART et al. [101] ont proposé un modèle de conformation pour un glycanne de type oligomannosidique comportant 9 résidus de mannose (Fig. 13). Les liaisons (α 1-2) entre les différents résidus de mannose adjacents créent 3 segments rigides dont l'un 4' A D₂ est replié vers l'unité di-N-acétylchitobiose du noyau rigide.

En se fondant sur les informations obtenues sur la conformation d'un glycanne de type N-acétyllactosaminique biantenné, la construction du modèle moléculaire d'un glycanne tétraantenné conduit à la conformation dite "en parapluie" ("umbrella-conformation") (Fig. 14) (MONTREUIL [97]). Cette conformation a été ensuite confirmée par RMN (BOCK et al. [102]) et par des expériences de diffusion de neutrons (LI et al. [96]). Il faut enfin signaler que des analyses de $^1\text{H-RMN}$ ont démontré une plus grande flexibilité de la liaison NeuAc (α 2-6), ces résidus d'acide sialique pouvant ainsi se replier le long de la

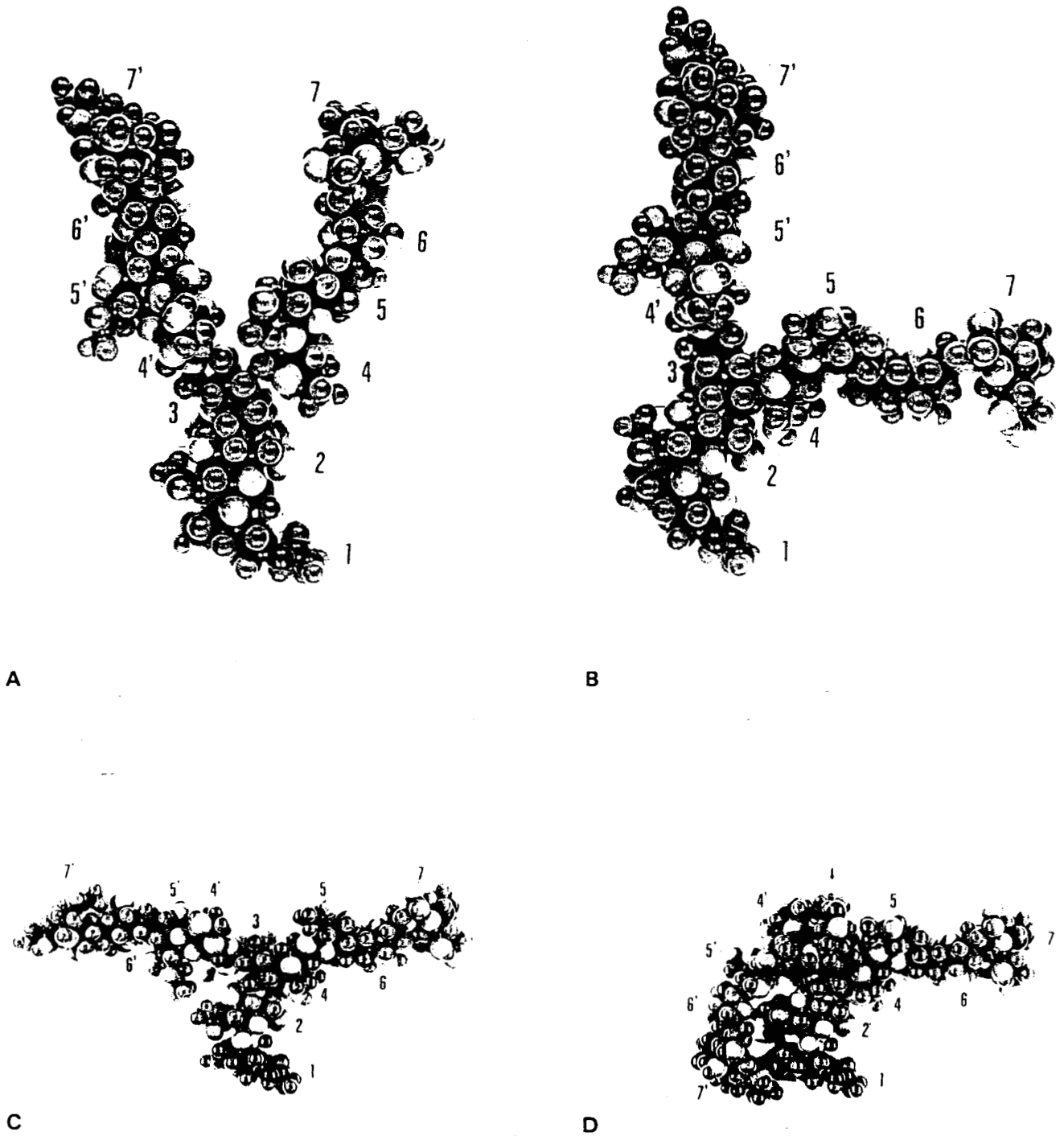


Fig. 12. Conformation spatiale d'un glycanne de type N-acétyllactosamine biantenné. a : conformation en Y (MONTREUIL [67]) ; b : conformation en T (MONTREUIL et al. [94]) ; c : conformation "en oiseau" (MONTREUIL [97]) ; d : conformation "en aile brisée" (MONTREUIL [100]).

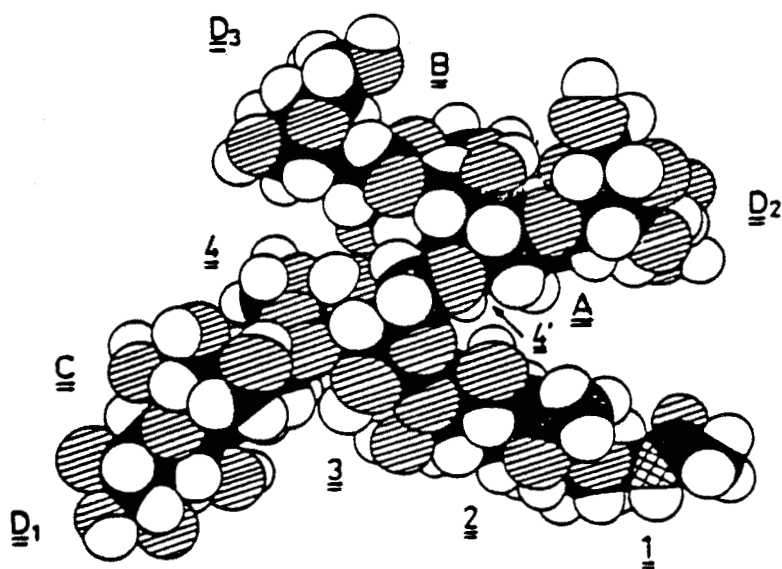


Fig. 13. Modèle de conformation d'un glycanne de type oligomannosidique comportant 9 résidus de mannose (VLIEGENTHART et al. [101]).

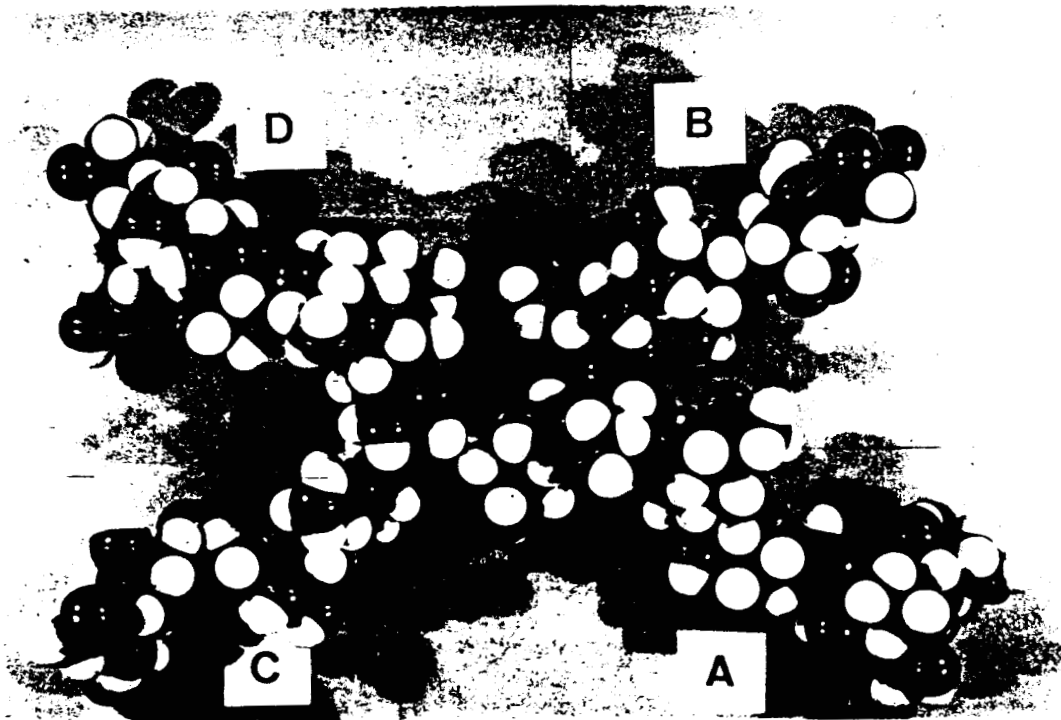


Fig. 14. Conformation spatiale d'un glycanne de type N-acétyllactosaminique tétraantenné (conformation dite "en parapluie") (MONTREUIL [97]).

séquence N-acétyllactosaminique. Au contraire, la liaison NeuAc(α 2-3) est plus rigide (MONTREUIL [103], VLIEGENTHART et al. [104]).

D - Implications biologiques liées à la conformation spatiale des glycanes.

1 - Interactions avec les lectines.

Ces conformations tridimensionnelles des glycanes permettent d'expliquer l'interaction de certaines lectines, y compris les lectines membranaires, avec des séquences oligosaccharidiques situées en position interne dans un glycanne. Ainsi, la substitution du résidu de β -mannose d'un glycanne biantenné par un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire lié en β 1-4 induit l'orientation dite "en ailebrisée" et explique la non réactivité de la Concanavalline A avec ce type de glycanne (voir publication n°3).

2 - Interactions avec les enzymes.

Grâce à cette conformation spatiale étalée, les glycanes sont également accessibles à l'action de diverses glycosidases ou de glycosyltransférases. L'activité de ces enzymes pourra être contrôlée par la conformation spatiale des glycanes. Ainsi, la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire lié en (β 1-4) sur le β -mannose bloque l'activité des N-acétylglucosaminyl-transférases II et III ainsi que celle de l' α 1-6 fucosyltransférase et de l' α -mannosidase II (SCHACHTER [105]).

3 - Interactions entre les glycanes et les protéines.

Un glycanne de type N-acétyllactosaminique tétraantenné, de par sa conformation en "parapluie", occupe une surface de $3\ 000\ \text{Å}^2$ et une glycoprotéine telle que l'orosomucoïde, de poids moléculaire 37.000, renfermant 5 de ces glycanes tétra- ou triantennés sera presque entièrement recouverte par ces glycanes.

Ceci permet d'expliquer la résistance de certaines protéines à l'action des protéases ou leur faible antigénicité (MONTREUIL [100]). De même, nous verrons qu'une des caractéristiques des glycoprotéines

membranaires de cellules malignes est d'être enrichie en glycanes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés et ceci peut expliquer pourquoi ces cellules échappent au contrôle du système immunitaire de l'hôte.

III - Antigénicité des glycanes des glycoprotéines membranaires.

Comme le montre le Tableau V (p.42), il existe de grandes similitudes structurales au niveau des séquences oligosaccharidiques périphériques pouvant substituer 3 types d'unités disaccharidiques de base que l'on retrouve, d'une part, chez les glycosphingolipides et, d'autre part, chez les N- ou O-glycosylprotéines (RAUVALA et FINNE [76], FEIZI [106], KOSCIELAK [107]). Ces séquences sont des déterminants de groupes sanguins.

A l'heure actuelle, outre les systèmes ABO et LEWIS, 21 autres systèmes de groupes sanguins regroupant 170 antigènes oligosaccharidiques ont été décrits (SANGER [108]). Il faut signaler que la séquence de type 3 : Gal(β 1-3)GalNAc, noyau commun aux glycanes des O-glycoprotéines, représente l'antigène T ou antigène de THOMSEN-FRIEDENREICH qui pourrait représenter un marqueur spécifique des carcinomes (SPRINGER [109]). D'autre part, les chaînes glycaniques liées O-glycosidiquement et renfermant cette séquence de type 3 que l'on retrouve sur la glycophorine A (Tableau I, p.23) représentent les déterminants antigéniques M et N. Cependant, l'activité MN est détruite lorsque la glycophorine est désialylée ou lorsqu'on libère les glycanes liés O-glycosidiquement par β -élimination. Ces chaînes oligosaccharidiques étant les mêmes pour les érythrocytes MM ou NN (LISOWSKA et al. [110]), l'expression des antigénicités M et N se situe au niveau du pentapeptide NH₂-terminal X-Ser-Thr-Thr-Y. Lorsqu'une sérine et un glycofolle occupent les positions 1 et 5, la réactivité M est exprimée tandis qu'une leucine et un acide glutamique déterminent la réactivité N, les résidus de sérine et de thréonine 2, 3 et 4 étant O-glycosylés (LISOWSKA [111]).

La répétition linéaire ou branchée de la séquence de type 2 : Gal(β 1-4)GlcNAc permet d'exprimer les antigènes i et I, associés aux phénomènes de différenciation cellulaire et de développement (FEIZI [112], HAKOMORI [113], FUKUDA et FUKUDA [114]). Ainsi, la bande III,

TABLEAU V

Similitudes structurales existant au niveau des séquences oligosaccharidiques périphériques des glycosphingolipides et des N- et O- glycosylprotéines (KOSCIELAK [107])

STRUCTURES	ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN
Fuc(α1-2)Gal(β1-3/4)G1cNAc-	H
GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3/4)G1cNAc-	A
Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3/4)G1cNAc-	B
GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)G1cNAc-	A ₁
Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]G1cNAc-	Le ^a
Fuc(α1-2)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]G1cNAc-	Le ^b
GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]G1cNAc-	A Le ^b
Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]G1cNAc-	B Le ^b
Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]G1cNAc-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)G1cNAc-	-
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)G1cNAc-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]G1cNAc-	-
NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]G1cNAc-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]G1cNAc-	-
Gal(α1-4)Gal(β1-4)G1cNAc-	P ₁

l'une des glycoprotéines majeures du globule rouge, est riche en glycannes de type poly-N-acétylactosaminique linéaires à activité antigénique i au stade foetal, alors que la même glycoprotéine des érythrocytes au stade adulte devient le support de l'antigénicité I (FUKUDA et al. [115]). Cependant, ces 2 antigènes i et I sont co-exprimés au niveau de la glycoprotéine membranaire T-200 des lymphocytes B adultes (CHILDS et al. [116]).

Enfin, nous verrons (Chapitre III) qu'un grand nombre de glycannes que l'on peut rattacher aux antigènes de groupes sanguins de type 1 ou 2 représentent des antigènes associés aux tumeurs et sont reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques (FEIZI et CHILDS [117], HAKOMORI [118]).

De nombreux antigènes membranaires sont également de nature glycoprotéinique, comme les antigènes d'histocompatibilité du système HLA chez l'Homme (STROMINGER et al. [119]), conférant aux tissus de chaque individu sa spécificité propre. Ces antigènes sont responsables du phénomène de rejet de greffe et on les trouve à la surface de presque toutes les cellules. Cependant, contrairement aux antigènes de groupes sanguins, les déterminants antigéniques de ces molécules sont associés à certaines régions de la protéine et il ne semble pas que les glycannes interviennent dans l'activité antigénique.

IV. CONCLUSIONS.

* Quel que soit le type de liaison glycanne-protéine, il apparaît que la séquence glycanne du point d'attache représente une entité invariable du glycanne. Par contre, une très grande microhétérogénéité est déterminée par les résidus glycosyls disposés à sa périphérie. Cette dualité noyau invariable/périphérie variable se retrouve d'ailleurs aussi dans les glycosphingolipides (HAKOMORI [33]).

* Il existe de grandes similitudes structurales au niveau des séquences glycaniques périphériques, que l'on retrouve, d'une part, chez les glycosphingolipides et, d'autre part, chez les N- ou O-glycosylprotéines (RAUVALA et FINNE [76], FEIZI [106]). Ces identités peuvent indiquer que ces motifs oligosaccharidiques sont synthétisés par les mêmes glycosyltransférases, dégradés par les mêmes glycosidases et seraient impliqués dans les mêmes fonctions biologiques : déterminants antigéniques, reconnaissance cellulaire et récepteurs de la surface cellulaire.

* Il convient d'associer à ces identités structurales des identités conformationnelles contrôlées par des points de branchement "stratégiques" (MONTREUIL [100]) associant une liaison (1-3) figée et une liaison (1-6) beaucoup plus flexible et que l'on retrouve également dans certains glycosphingolipides de la série lacto-iso-octaose (HAKOMORI [30]) ainsi que dans les N- ou O-glycosylprotéines (Fig. 15).

Ces points de branchement induiraient une conformation étalée des glycannes, favorisant ainsi leurs interactions avec les protéines, les interactions glycanne-glycanne, l'action d'enzymes ou la reconnaissance de ces signaux par diverses molécules (lectines, anticorps, hormones, etc...) (MONTREUIL [100]).

* Enfin, des changements mineurs, au niveau de la structure primaire des glycannes membranaires peuvent se traduire par des modifications importantes de la conformation tridimensionnelle de ces glycannes et perturber ainsi profondément leurs fonctions biologiques (cf. p.40).

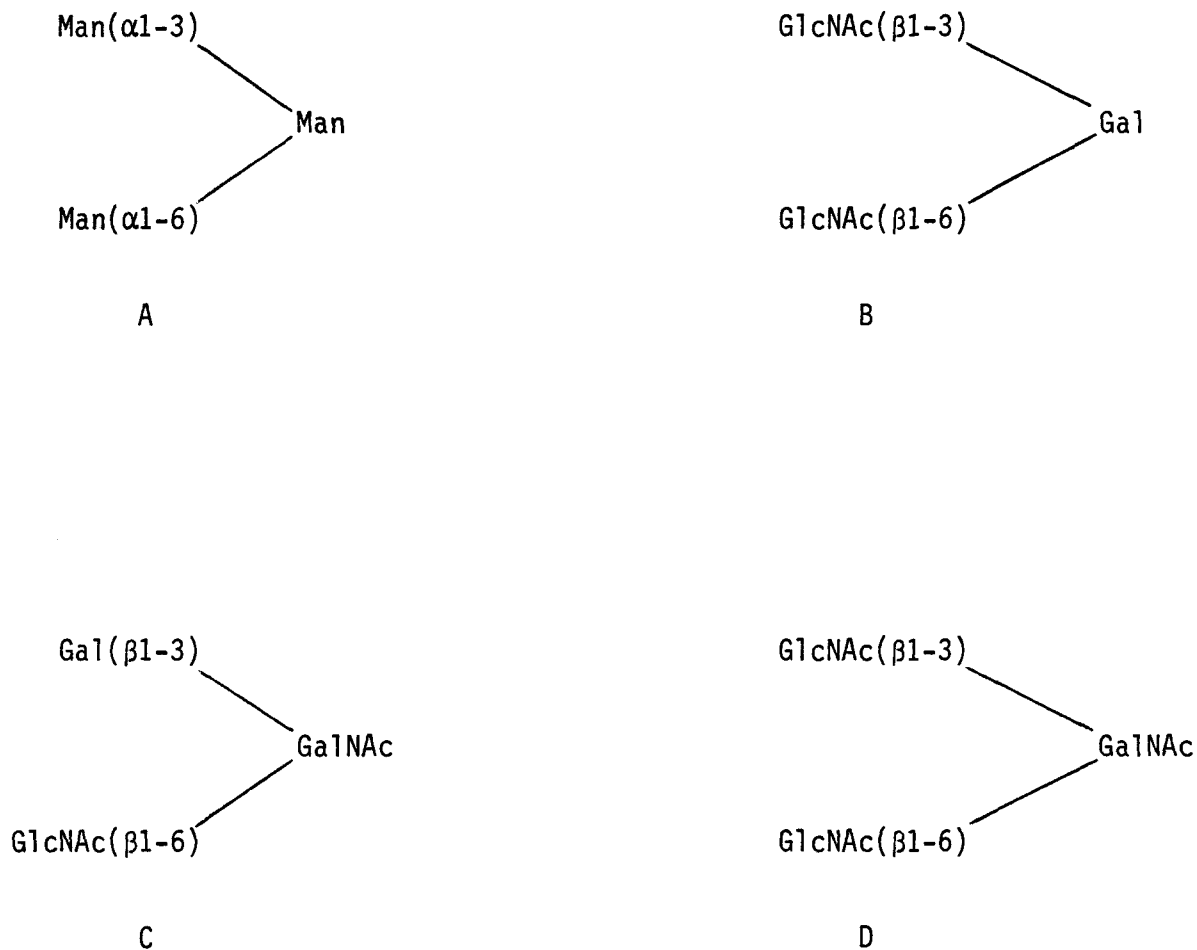


Fig. 15. Points de branchement associant des liaisons (1-3) et (1-6).

A - Noyau central des glycanes liés N-glycosidiquement.

B - Point de branchement trouvé dans les glycanes liés N-glycosidiquement de type poly-N-acétyllactosaminique branchés ainsi que dans les glycosphingolipides de la série Lacto-iso-octaose.

C - Point de branchement existant dans de nombreux glycanes de O-glycosylprotéines.

D - Point de branchement trouvé dans des glycanes liés O-glycosidiquement de mucine gastrique de mouton (HOUNSELL et al. [120]).

CHAPITRE II

ROLES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

De nombreuses hypothèses concernant le rôle des glycanes des glycoprotéines en général et des glycoprotéines membranaires en particulier ont été proposées (SHARON et LIS [121], MONTREUIL [43], BERGER et al. [122]). Cependant, en raison du peu de données structurales ou conformationnelles sur ces glycanes ainsi que des difficultés rencontrées pour étayer ces hypothèses sur le plan expérimental, les informations obtenues sur les relations glycanne-fonction biologique restent très fragmentaires. Les informations dont nous disposons ont généralement été obtenues grâce aux approches expérimentales suivantes :

- Une première approche consiste à faire agir sur les glycoprotéines des exoglycosidases spécifiques. Ainsi, l'action d'une sialidase sur la glycophorine A lui fait perdre son antigénicité M ou N (MAKELA et CANTELL [123]) démontrant ainsi clairement le rôle des résidus d'acide sialique dans l'expression de cette activité antigénique.

De même, l'isolement récent de peptide-N⁴-(N-acétyl-β-glucosaminyl) asparagine amidases d'amande (TAKAHASI [124]) ou de Flavobacterium meningosepticum (PLUMMER et al. [125]) à spectre d'action très large devrait permettre l'étude du rôle des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires.

- Une autre approche fait appel à différents inhibiteurs de la N-glycosylation des protéines telle que la tunicamycine, grâce à laquelle certains aspects du rôle des glycanes des N-glycosylprotéines ont pu être précisés (TAMURA [126]), ou de la maturation ("Processing") de ces glycanes telles que la swainsonine, la castanospermine ou la 1-désoxynojirimycine (voir les revues de SCHWARZ et DATEMA [127] et de FUHRMANN et al. [128]).

- Une troisième approche consiste à sélectionner des mutants cellulaires résistants à l'action cytotoxique de certaines lectines

(STANLEY [129], BRILES [130]). Ces variants lectine-résistants, généralement déficients en certaines glycosyltransférases, présentent des altérations des glycannes de leurs glycoprotéines membranaires et constituent des outils nouveaux pour étudier le rôle de ces derniers, leur biosynthèse et le contrôle génétique de leur biosynthèse (LIS et SHARON [131]).

C'est cette approche expérimentale que nous avons choisie afin d'étudier le rôle des glycannes membranaires dans le phénomène de diffusion métastatique (cf. publications n°1 et 13).

- Enfin, une dernière approche expérimentale introduite récemment par TOLVANEN et GAHMBERG [132] consiste à modifier in vivo la structure des glycannes membranaires par addition covalente de résidus monosaccharidiques ou oligosaccharidiques supplémentaires et à étudier les conséquences biologiques de ces modifications structurales.

L'utilisation de ces différentes méthodes a permis d'attribuer aux glycannes des glycoprotéines membranaires deux rôles principaux : un rôle dans le contrôle du métabolisme cellulaire et un rôle dans le contrôle de la vie sociale des cellules.

I - Rôles joués par les glycannes dans le métabolisme cellulaire.

A - Stabilisation des membranes biologiques.

Une Archéobactérie, Halobacterium salinarium, renferme une glycoprotéine de surface de haut poids moléculaire impliquée dans la stabilisation de l'architecture membranaire et dans le maintien de la morphologie cellulaire (MESCHER [133]). La croissance de ces bactéries en bâtonnet dans un milieu de culture renfermant de la bacitracine, antibiotique bloquant la biosynthèse des intermédiaires lipidiques de la glycosylation, se traduit par un arrêt de la glycosylation de cette glycoprotéine et par une conversion de la forme en bâtonnet en une forme sphérique.

Chez les organismes pluricellulaires, nous avons vu précédemment que les glycoprotéines de structure de la matrice extracellulaire

(fibronectines, laminine) constituent un exosquelette et sont impliquées dans le maintien de l'architecture membranaire.

Bien que le rôle des glycanes des glycoprotéines membranaires soit moins net, TANNER [134] a suggéré que ceux du globule rouge constitueraient un réseau à la surface cellulaire stabilisé par des ponts hydrogènes et par des liaisons ioniques entre le Ca^{++} et les groupements carboxyliques des acides sialiques et la surface cellulaire, contribuant ainsi à une stabilisation de la membrane.

D'autre part, la désialylation des glycoprotéines membranaires de cellules ascitiques d'Ehrlich se traduit par une plus grande fragilité de la membrane de surface de ces cellules (MESCHER [133]).

B - Contrôle de la perméabilité membranaire.

Les glycanes des glycoconjugués membranaires contrôleraient la perméabilité membranaire en jouant sur l'orientation et la concentration des molécules d'eau au niveau de la membrane cellulaire ainsi que sur les transferts d'ions ou de substances de faible poids moléculaire à travers cette membrane (MONTREUIL [43]).

Ce concept est né des travaux de FEENEY [135] et de VANDENHEEDE et al. [136] sur la glycoprotéine antigél des poissons de l'Antarctique, capable d'abaisser le point de congélation du sang de ces poissons, démontrant que la modification chimique ou enzymatique des sucres de la glycoprotéine entraîne la disparition de l'effet antigél. La glycoprotéine renferme des séquences peptidiques répétitives Ala-Ala-Thr substituées O-glycosidiquement par des unités disaccharidiques Gal(β 1-3)GalNAc, qui forment des ponts hydrogènes avec les molécules d'eau et empêchent ainsi la formation de cristaux de glace. On conçoit que par un mécanisme semblable, l'orientation et la concentration des molécules d'eau à la surface cellulaire et par conséquent, les mouvements d'ions minéraux ou de substances organiques de faible poids moléculaire soient contrôlés par les glycanes des glycoconjugués membranaires et en particulier, par le rapport entre les résidus hydrophiles d'acide sialique et les résidus relativement hydrophobes de fucose de ces glycoconjugués membranaires.

C - Rôle des glycanes dans la conformation des glycoprotéines membranaires.

Des études réalisées avec diverses glycoprotéines de type mucine, riches en résidus d'acide sialique, ont montré qu'ils étaient responsables de la grande viscosité de ces glycoprotéines. En effet, à cause de son pK très bas (2,2), la fonction carboxylique de l'acide sialique est dissociée aux pH physiologiques et la forte densité de ces groupements carboxyliques chargés négativement confère à ces molécules de mucines une structure gélifiée en bâtonnet que l'on retrouve par exemple dans l'épiglycanine des cellules TA₃-Ha (CODINGTON [54]) (cf. p.24).

Un autre exemple démontrant l'importance de la glycosylation dans la stabilisation de la conformation des glycoprotéines est constitué par la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (GIBSON et al. [137]). En bloquant la glycosylation par la tunicamycine, cette glycoprotéine s'accumule sous forme d'aggrégats peu solubles à l'intérieur de la cellule hôte et n'est plus transportée à la surface des cellules infectées pour participer à l'assemblage du virus.

D - Rôle protecteur des glycanes des glycoprotéines contre les attaques protéolytiques.

De nombreux exemples démontrent l'augmentation de la sensibilité à la protéolyse de protéines non glycosylées, synthétisées en présence de tunicamycine. Ainsi, les travaux du groupe de OLDEN [138] montrent que la fibronectine, glycoprotéine majeure de la surface cellulaire des fibroblastes d'embryon de poulet ou le récepteur de l'acétylcholine de muscle embryonnaire sont dégradés plus rapidement dans des cultures cellulaires traitées par la tunicamycine.

Cette protéolyse est partiellement inhibée par addition d'inhibiteurs de protéases comme la leupeptine. In vitro, les fibronectines non glycosylées sont hydrolysées plus rapidement par la pronase ou la trypsine que les fibronectines glycosylées. En particulier, le domaine non glycosylé responsable de la fixation aux collagènes, est

totalemment hydrolysé par action de la trypsine ou de la chymotrypsine alors que le même fragment glycosylé de fibronectines natives résiste à l'action de ces enzymes. En outre, la plus grande résistance de la fibronectine de placenta humain, comparée à la fibronectine plasmatique, peut s'expliquer par un taux de glycosylation plus élevé de la forme placentaire (ZHU et al. [139]). Il faut cependant signaler que l'absence de glycosylation ne semble pas perturber les activités biologiques de la fibronectine qui, comme la fibronectine native, reste capable d'induire l'étalement de cellules en culture sur un substrat et leur attachement à une matrice de collagène (OLDEN et al. [138]).

Enfin, la glycosylation de certaines protéines peut être un moyen utilisé par certaines cellules pour réaliser une protéolyse ménagée. Ainsi, l'adrénocorticotrophine, la β -lipotrophine, l' α -MSH et la β -endorphine sont quatre hormones glycoprotéiniques provenant d'un précurseur glycosylé unique synthétisé au niveau du lobe neurointermédiaire chez l'Amphibien Xenopus leavis, grâce à un mécanisme de protéolyse ménagée contrôlée par les glycanes de la molécule (LOH et GAINER [140]).

II - Rôles joués par les glycanes des glycoprotéines membranaires dans la vie sociale des cellules.

A - Rôle des glycanes dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire

Depuis la découverte de GESNER et GINSBURG [141] montrant que la redistribution ("homing") des lymphocytes soumis à l'action d'une fucosidase était perturbée, suivie de la démonstration apportée par le groupe d'ASHWELL (MORELL et al.[142]) de la reconnaissance des asialoglycoprotéines sériques par des récepteurs spécifiques des hépatocytes de Mammifère, un grand nombre d'observations permettent d'impliquer les glycanes de la surface cellulaire dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion intercellulaires.

Les glycanes des glycoprotéines membranaires constituent des signaux de reconnaissance reconnus spécifiquement par des récepteurs lectiniques présents à la surface d'autres cellules. Deux types d'interactions glycanes-récepteurs ont été proposés.

1 - Interaction ectoglycosyltransférase membranaire - glycanne (hypothèse de ROSEMAN) [143].

Bien que les glycosyltransférases soient essentiellement localisées dans le réticulum endoplasmique, leur présence dans la membrane plasmique a également été mise en évidence (SHUR et ROTH [144], VERBERT et al. [145], PIERCE et al. [146]). Dans les années 1970, ROSEMAN proposa une interaction entre les glycanne d'une cellule et les glycosyltransférases de surface d'une autre cellule (Fig. 16 a). Bien que l'intervention directe des ectoglycosyltransférases dans ces phénomènes d'adhésion intercellulaire n'ait pu être réellement démontrée, un tel mécanisme a été invoqué pour expliquer :

- l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène lors de la coagulation sanguine (JAMIESON et al. [147]),
- l'adhésion entre des cellules embryonnaires neurales de la rétine (ROTH et al. [148]),
- la reconnaissance entre les gamètes de Chlamydomonas,
- l'adhésion entre des cellules de carcinome embryonnaire F9EC, par l'intermédiaire de glycanne de type poly-N-acétyllactosaminique présents à la surface d'une cellule et des ectogalactosyltransférases appartenant à une cellule adjacente (SHUR [149]).

2 - Interaction lectine membranaire - glycanne.

Depuis la caractérisation, par le groupe d'ASHWELL, des lectines membranaires hépatiques responsables de la capture des asialoglycoprotéines circulantes, de nombreuses autres lectines membranaires ont été mises en évidence dans presque toutes les cellules, depuis les bactéries jusqu'aux cellules animales (MONSIGNY et al. [150], BARONDES [151], MONSIGNY et al. [152], LIS et SHARON [153]). Ces lectines membranaires sont impliquées dans la capture de glycoprotéines circulantes, dans des phénomènes d'adhésion intercellulaire ou dans le trafic intracellulaire de certaines glycoprotéines, l'exemple le plus significatif étant représenté par les lectines membranaires spécifiques des résidus de mannose-6-phosphate, impliquées dans le ciblage des enzymes lysosomiaux vers les lysosomes (voir la revue générale de VON FIGURA et HASILIK [154]).

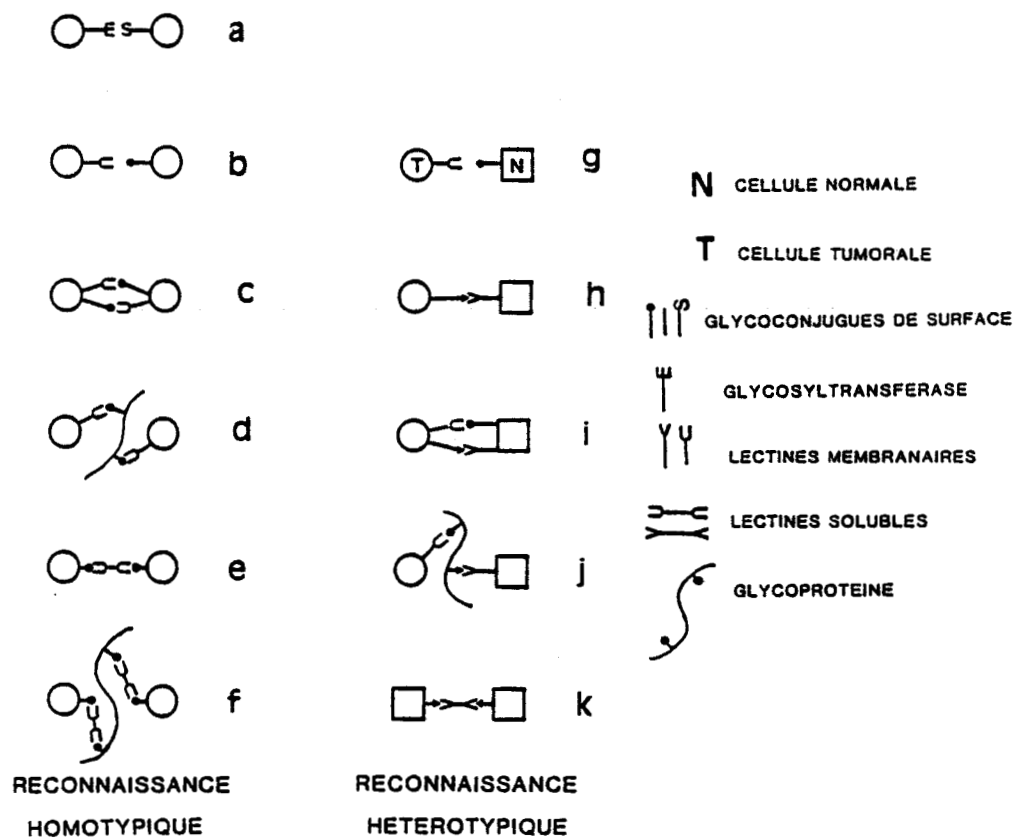


Fig. 16. Différents mécanismes expliquant la reconnaissance et l'adhésion des cellules normales ou malignes et nécessitant la participation des glycoconjugués membranaires.

Le Tableau VI (p.54) présente quelques unes de ces lectines membranaires.

Les lectines membranaires reconnaissent les glycanes des glycoconjugués de cellules voisines et favorisent les adhésions cellulaires (Fig. 16 b et c) (voir la revue de BRANDLEY et SCHNAAR [155]). Ces mécanismes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire sont présents tout au long de l'arbre phylogénique.

- Ainsi, OFEK et al. [156] ont étudié la fixation d'Escherichia coli sur des cellules épithéliales de la cavité buccale et ont montré que l'on pouvait inhiber la lectine bactérienne par addition de D-mannose.

- Un autre exemple est constitué par les virus de l'influenza qui possèdent une hémagglutinine capable de reconnaître les résidus d'acide sialique de la cellule hôte (PAULSON [157]). La fixation des virus sur les globules rouges est inhibée par l'action préalable d'une sialidase et peut être restaurée par incubation des cellules en présence de CMP-NeuAc et de sialyltransférases purifiées. PAULSON a aussi démontré la grande spécificité de ces hémagglutinines virales : certaines reconnaissant spécifiquement les résidus d'acide sialique liés en (α 2-3) sur le galactose alors que d'autres reconnaissent les résidus d'acide sialique liés en (α 2-6).

- Chez certaines levures, telle que Hansenula wingei, des types haploïdes opposés s'agglutinent pour fusionner. Chacun d'eux se caractérise par une glycoprotéine de surface complémentaire de celle de l'autre type cellulaire. Cependant, l'une de ces glycoprotéines représente la lectine capable de reconnaître les glycanes riches en mannose de l'autre glycoprotéine cellulaire (BURKE et al. [158]).

- L'amibe Dictyostelium discoideum est capable de s'associer en agrégats pluricellulaires lorsque les conditions de milieu sont défavorables, par l'intermédiaire de deux lectines membranaires, les discoidines I et II, reconnaissant spécifiquement des résidus de galactose et de N-acétylgalactosamine sur les glycanes des glycoconjugués membranaires des cellules voisines (FRAZIER et al. [159]).

TABLEAU VI

Spécificité et localisation de quelques lectines membranaires mises en évidence dans le règne animal

LECTINE	MONOSACCHARIDE INHIBANT L'AGGLUTINATION	LOCALISATION	REFERENCE
Electrolectine	Thiodigalactoside et à un degré moindre le lactose	Organe électrique de l'anguille <i>Electrophorus</i>	TEICHBERG <i>et al.</i> [160]
Lectine hépatique des asialo-glycoprotéines	α -méthyl GalNAc >Gal >GalNAc	Hépatocytes de Lapin	HUDDIN <i>et al.</i> [161]
Lectine hépatique des asialo-agalacto-glycoprotéines	GlcNAc	Hépatocytes de Poulet	LUNNEY <i>et ASHWELL</i> [162]
Lectine hépatique des protéines à mannose ou à N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice (ACHORD <i>et al.</i> [163])	---	Cellules de KUPFER et cellules endothéliales Macrophages alvéolaires de Rat	HUBBARD <i>et al.</i> [164] STAHL <i>et al.</i> [165]
Lectine hépatique des fucosyl(α 1-3)-glycoprotéines	---	Hépatocytes de Souris	PRIEELS <i>et al.</i> [166]
Lectine des glycoprotéines à Mannose-6-phosphate	---	Foie de Boeuf	SAHAGIAN <i>et al.</i> [167]
Lectine d'embryon de Poulet (CLL-I)	Thiodigalactosides et à un degré moindre le lactose	Muscle d'embryon de Poulet	NOWAK <i>et al.</i> [168]
Lectines de lymphocyte	Gal, Man, GlcNAc, GalNAc	Splénocytes et thymocytes de Souris	KIEDA <i>et al.</i> [169, 170]
Lectine de cellules du tératocarcinome de Souris	Man	Tératocarcinome de Souris	GRABEL <i>et al.</i> [171]

- Chez l'Eponge, les adhésions intercellulaires sont sous la dépendance des glycanes membranaires riches en résidus d'acide glucuronique, représentant des signaux de reconnaissance pour un facteur d'aggrégation soluble (lectine soluble) spécifique de ces résidus (MULLER et MULLER [172]).

- Lors de la fertilisation de l'oeuf d'Oursin, VACQUIER et MOY [173] ont démontré une interaction spécifique entre une protéine de l'acrosome du spermatozoïde et les glycanes d'une glycoprotéine de la surface de l'oeuf. Cette interaction est inhibée par addition de glycoconjugués riches en fucose.

- Lors de la redistribution des lymphocytes du sang vers les ganglions lymphoïdes impliquant leur diffusion au travers des veinules endothéliales ganglionnaires, STOOLMAN et al. [174] ont montré que la fixation des lymphocytes aux veinules endothéliales faisait intervenir des lectines membranaires lymphocytaires reconnaissant des glycanes phosphorylés ou sulfatés à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction est inhibée par addition de mannose-6-phosphate ou d'un polysaccharide de levure riche en mannose-6-phosphate ou par la fucoidine, un polymère de fucose-4-sulfate.

- Enfin, dans le processus de diffusion métastatique, la colonisation spécifique de certains organes cibles par les cellules cancéreuses pourrait faire intervenir de telles associations, d'une part, entre les lectines membranaires de ces cellules et des glycanes spécifiques du tissu cible et/ou une interaction entre les glycanes de surface des cellules cancéreuses et les lectines membranaires du tissu cible (Fig. 16 g, h et i) (RAZ et LOTAN [175], SPRINGER et al. [176], MONSIGNY et al. [177], GABIUS et al. [178]).

D'autres lectines peuvent également intervenir dans ces phénomènes de reconnaissance et d'adhésion intercellulaire. Il s'agit de lectines solubles comme, par exemple, la lectine isolée de l'organe électrique de l'anguille Electrophorus electricus, spécifique de résidus de β -galactose (LEVI et TEICHBERG [179]). De nombreuses autres lectines solubles présentant la même spécificité ont été caractérisées chez les Amphibiens, les Oiseaux et les Mammifères (voir la revue de BARONDES [180]). Elles présentent une grande similitude sur le plan structural :

poids moléculaire et organisation sous unitaire identique (2 sous-unités de poids moléculaire 15000) et sur le plan immunologique. Leur concentration dépend du stade de développement de l'individu : la lectine I lactose-spécifique du muscle de Poulet est d'abord intracellulaire, puis devient extracellulaire au cours de développement.

Ces lectines solubles peuvent intervenir dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion intercellulaire en reconnaissant des glycanes complémentaires appartenant aux cellules environnantes, ou aux glycoconjugués de la matrice extracellulaire (Fig. 16 e et f). Ainsi, la lectine spécifique des résidus de β -galactose du poumon de Rat se trouve concentrée au niveau des fibres élastiques, forme spécialisée de cette matrice extracellulaire (CERRA et al. [181]).

Il faut rappeler que d'autres constituants des matrices extracellulaires sont impliqués dans ces phénomènes d'adhésion intercellulaire. Il s'agit des fibronectines, de la laminine, des collagènes et des protéoglycanes. Ces molécules sont capables de s'associer et de reconnaître des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire (Fig. 16 d et j) (voir la revue de RUOSLAHTI [182]).

Dans le cas de la fibronectine, les glycanes de cette glycoprotéine semblent moduler ces interactions. L'absence de glycosylation induite par l'action de la tunicamycine entraîne une augmentation de l'affinité des fibronectines pour les collagènes de la matrice et augmente ainsi leur pouvoir adhésif (JONES et al. [183]). Au contraire, la présence de glycanes de type poly-N-acétyllactosaminique sur ces fibronectines (stade foetal) diminue leur affinité pour les collagènes sans affecter de façon significative leur pouvoir adhésif envers les cellules (ZHU et al. [139], YAMAGUCHI et al. [184]).

D'autre part, les glycanes des glycoprotéines membranaires interviendraient dans ce phénomène d'adhésion aux fibronectines, car des fibroblastes de rein de Hamster, cultivés en présence de tunicamycine, présentent un défaut d'adhésion aux fibronectines (BUTTERS et al. [185]).

La transformation maligne des cellules bouleverse profondément la structure des glycanes cellulaires, qu'ils appartiennent aux glycoprotéines de la membrane ou aux fibronectines (voir les

publications n°10 et 11) et perturbe ainsi profondément les interactions :

- lectines membranaires et/ou solubles-glycannes de la surface cellulaire,
- lectines membranaires et/ou solubles-glycannes des glycoprotéines de structure des matrices extracellulaires,
- glycoprotéines de structure des matrices extracellulaires-glycoconjugués de la surface cellulaire.

Ces transformations pourraient être en partie responsables des perturbations du comportement social que présentent les cellules cancéreuses et, en particulier, de la diffusion métastatique (DEBRAY [186], SMETS [187]).

3 - Autres glycoprotéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire

D'autres glycoprotéines intervenant dans l'aggrégation des cellules ont été mises en évidence dans différents tissus et ont été regroupées sous le nom de CAM ("Cell adhesion molecules"). Selon leur origine, on distingue les N-CAM ("Neural cell adhesion molecules") dans la rétine ou le cerveau (BRACKENBURY et al. [188]), les L-CAM ("liver cell adhesion molecule") dans le foie (OCKLIND et OBRINK [189]) et les NG-CAM intervenant dans l'adhésion entre cellules gliales et neurones (GRUMET et al. [190]). Des anticorps contre la N-CAM inhibent spécifiquement l'aggrégation des cellules neurales de la rétine.

Une caractéristique structurale intéressante de ces sialoglycoprotéines est la diminution de leur taux d'acide sialique lors du passage du stade embryonnaire au stade adulte (FINNE [191]). La forme embryonnaire renfermerait des glycannes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés, présentant des enchaînements d'au moins 12 résidus d'acide N-acétylneuraminique reliés par des liaisons (α 2-8), type de liaison que l'on retrouve également chez certains gangliosides (FINNE [191]).

Les adhésions entre cellules neurales ainsi que leur organisation dans le tissu cérébral adulte seraient contrôlées par une diminution du nombre de ces résidus d'acide sialique (EDELMAN [192], RUTISHAUSER [193]).

B - Rôle des glycanes membranaires dans le phénomène d'inhibition de contact.

Les cellules transformées ont perdu la propriété qu'ont les cellules normales d'arrêter de se déplacer lorsqu'elles entrent en contact : c'est l'inhibition de contact de mouvement décrit par ABERCROMBIE et HEAYSMAN [194] et par ABERCROMBIE et al. [195]. Ce phénomène est distinct de l'inhibition de contact de croissance, encore appelée inhibition de croissance dépendant de la densité cellulaire, présentée par les cellules normales et absente chez les cellules transformées. La croissance des cellules normales dépend de facteurs de type hormonal présents dans les sérums avec lesquels on complémente les milieux de culture : lorsque le milieu s'épuise, les cellules normales arrêtent de se multiplier alors que les cellules transformées continuent leur croissance (DULBECCO [196], STOKER et RUBIN [197]).

1 - Participation des glycanes de type oligomannosidique des glycoprotéines membranaires dans l'inhibition de contact de croissance

De nombreux travaux ont montré que les membranes de cellules en phase de multiplication cellulaire active ou celles des cellules transformées, présentant également une croissance rapide, étaient plus riches en glycanes de type oligomannosidique que les cellules en phase stationnaire (CECCARINI et al. [198], MURAMATSU et al. [199]). Ces résultats furent précisés par HAKIMI et ATKINSON [200] grâce à l'introduction du virus Sindbis dans des cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet. Dans ce modèle, le virus détourne à son profit l'équipement glycosyltransférase de la cellule hôte pour glycosyler les deux protéines E₁ et E₂ de son enveloppe. Les virus isolés à partir de cultures cellulaires en phase exponentielle de croissance possèdent plus de glycanes de type oligomannosidique et

ces glycanes renferment plus de résidus d' α -mannose que ceux isolés à partir de cultures cellulaires en phase stationnaire.

Ces travaux permettent ainsi d'attribuer aux glycanes de type oligomannosidique de la surface cellulaire un rôle dans le contrôle de l'inhibition de contact de croissance.

Il convient, d'autre part, d'établir une relation entre ces résultats et les travaux de BURGER et NOONAN [201] effectués sur des fibroblastes 3T3 qui, transformés par le virus du polyome, ne présentent plus cette inhibition de contact de croissance. L'addition de Concanavaleine A monovalente, ne provoquant plus l'agglutination de ces cellules, restaure cependant l'inhibition de contact. Or, parmi les récepteurs potentiels de la Concanavaleine A se trouvent les glycanes de type oligomannosidique.

Par ailleurs, RAUVALA et HAKOMORI [202] ont démontré plus récemment que les glycanes de type oligomannosidique intervenaient dans l'adhésion de fibroblastes de Hamster par interaction entre ces glycanes et une α -mannosidase de surface d'une autre cellule.

2 - Participation des glycanes des glycosphingolipides membranaires dans l'inhibition de contact de croissance

HAKOMORI [203] a démontré le premier l'augmentation de la complexité de la copule glycanique d'hématosides de la surface cellulaire associée à l'inhibition de contact de croissance chez les cellules normales, les cellules transformées ne présentant pas ce phénomène.

SAKIYAMA et al. [204], après une étude exhaustive d'un grand nombre de clones cellulaires présentant le phénomène d'inhibition de contact de croissance, ont cependant montré qu'il n'existait aucune corrélation entre la présence ou l'absence d'un glycolipide donné et l'inhibition de contact. Le seul point commun présenté par toutes les lignées cellulaires étudiées est une augmentation du taux des glycosphingolipides dépendant de la densité cellulaire lorsque les cultures

arrivent à confluence. Cependant, des études plus récentes (voir la revue de HAKOMORI [205]) semblent établir une corrélation entre une diminution du taux des gangliosides GM₁ et GM₃ et la perte de l'inhibition de contact de croissance. L'addition de ces gangliosides dans le milieu de culture restaure le phénomène et modifie l'affinité des récepteurs membranaires pour divers facteurs de croissance. Elle restaurerait en fait la phosphorylation des résidus de tyrosine de ces récepteurs nécessaire à leur bon fonctionnement, par modulation de la protéine kinase C (BREMER et al. [206]). Des travaux récents ont d'ailleurs démontré que l'addition de gangliosides à une préparation partiellement purifiée de protéine kinase C inhibait l'activité de l'enzyme (KREUTTER et al. [207]).

C - Les glycanes des glycoprotéines membranaires sont des récepteurs de molécules solubles

CUATRECASAS et ILIANO [208] ont démontré que les récepteurs de l'insuline de l'hépatocyte ou de l'adipocyte sont des glycoprotéines dont la désialylation supprime les effets physiologiques de l'insuline, mais n'empêche pas sa fixation. Celle-ci est par contre inhibée lorsque le récepteur est soumis à l'action d'une β -galactosidase (CUATRECASAS [209]).

Un grand nombre de lectines végétales reconnaissent à la surface cellulaire divers glycanes appartenant à des N-, O- ou N,O-glycosylprotéines. Certaines de ces lectines, comme la ricine (RCA_{II}), l'abrine ou la modeccine, sont extrêmement toxiques (OLSNES et PIHL [210]) et, après reconnaissance de récepteurs glycaniques et internalisation, elles inhibent les synthèses protéiques cellulaires, entraînant la mort de ces cellules.

Au contraire, d'autres lectines, comme la Convanaline A ou l'isolectine L₄-PHA isolée de Phaseolus vulgaris, induisent la transformation blastique des lymphocytes (LIS et SHARON [211]) tout en étant cytotoxiques à forte concentration (100 μ g/ml) après fixation sur des récepteurs glycaniques bien précis de la surface cellulaire. Par exemple, la lectine de l'arachide Arachis hypogaea (PNA) n'exerce son pouvoir mitogène sur les lymphocytes humains qu'après traitement

de ces derniers par une sialidase, démasquant ainsi les séquences Gal(β 1-3) GalNac liées O-glycosidiquement à la protéine et reconnues spécifiquement par cette lectine (NOVOGRODSKY [212]).

III - CONCLUSIONS.

A travers ces différentes études, les deux rôles principaux que l'on peut attribuer aux glycannes des glycoprotéines membranaires se dégagent clairement. Le premier est d'ordre physico-chimique : les glycannes stabilisent les protéines, contribuent à la formation et au maintien de leurs structures tertiaires et les protègent de l'action des protéases. Le second est d'ordre biologique : les glycannes constituent des signaux reconnus par de nombreuses lectines et récepteurs membranaires. Dans certaines maladies métaboliques héréditaires, déficits en enzymes lysosomiaux par exemple, ces signaux de reconnaissance vont être perturbés. De même, la transformation maligne des cellules s'accompagne de profondes modifications des glycannes des glycoconjugués membranaires, rendus ainsi responsables du comportement asocial de ces cellules.

CHAPITRE III

MODIFICATIONS DES GLYCOCONJUGUES DE LA SURFACE CELLULAIRE ASSOCIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE

I - Concept d'une glycosylation anormale des glycosphingolipides et des glycoprotéines associée à la transformation maligne

Les cellules transformées par voie chimique ou virale, mais également les cellules de tumeurs spontanées, incluant une large variété de cancers humains, présentent des structures glycaniques différentes de celles de leurs homologues non transformées.

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux ont permis de caractériser les modifications affectant les glycoconjugués de cellules tumorales.

L'isolement et l'étude des glycannes des glycosphingolipides ont posé techniquement moins de problèmes que ceux présentés par l'étude des chaînes glycaniques des glycoprotéines beaucoup plus hétérogènes. D'autre part, si les glycolipides restent antigéniques après isolement, il n'en est pas de même pour les glycannes des glycoprotéines. C'est pour cette raison que des anticorps antiglycannes de glycolipides ont permis d'identifier certains épitopes oligosaccharidiques de glycoprotéines (HAKOMORI [118]).

Enfin, s'il est relativement facile d'isoler un glycosphingolipide donné afin d'étudier ses modifications structurales associées à la transformation maligne, cela est beaucoup plus difficile pour les glycoprotéines. Cependant, nous avons pu réaliser cette approche expérimentale dans le cas des fibronectines de cellules normales et transformées, car il s'agissait de glycoprotéines très faciles à purifier (voir publication n°11).

D'autre part, bien que les protéoglycannes constituent une autre famille de glycoconjugués subissant également de profondes modifications structurales lors de la transformation maligne, ces modifica-

tions ne seront pas abordées ici (voir à ce sujet la revue de READING et HUTCHINS [213]).

A - Modifications des glycanes des glycosphingolipides associées à la transformation maligne.

Quatre types de modifications structurales des glycanes des glycolipides (voir Tableau VII, p.64, pour leur nomenclature) sont associés à la transformation maligne (voir les revues de HAKOMORI et KANNAGI [30], HAKOMORI [205] et HAKOMORI [118]).

1 - Synthèse incomplète des glycanes avec ou sans accumulation de précurseurs.

De nombreux travaux réalisés sur les glycolipides de fibroblastes normaux ou transformés par infection virale (HAKOMORI [214]), de leucocytes de sujets normaux ou leucémiques (MACHER et al. [215]), de carcinomes mammaires (KEENAN et MORRE [216]) ou de divers cancers gastro-intestinaux (SIDDIQUI et al. [217]) démontrent une synthèse incomplète de certains glycolipides, due à un blocage d'une ou de plusieurs glycosyltransférases, associée à la transformation maligne. Selon le type de glycolipide affecté ou selon qu'il y a ou non accumulation du glycolipide précurseur, HAKOMORI [118] distingue 5 classes de synthèse incomplète (voir Tableau VIII, p.65).

2 - Synthèse de glycolipides tumoraux.

L'expression de nouveaux glycolipides, souvent associée à une synthèse incomplète d'autres glycolipides, est le résultat de l'activité de nouvelles glycosyltransférases caractéristiques des cellules tumorales et qui étaient très faiblement actives voire absentes des cellules normales. Là encore, HAKOMORI [118] distingue 5 types différents de nouveaux antigènes (Tableau VIII, p.65).

Les glycolipides précurseurs résultant d'une synthèse incomplète ou ces nouveaux glycolipides peuvent être caractérisés par les techniques classiques d'immunochimie (HAKOMORI et KANNAGI, [30]) à l'aide d'anticorps monoclonaux très spécifiques (HAKOMORI [205]) et, comme nous le verrons plus loin, certains épitopes glycaniques sont communs aux glycolipides et aux glycoprotéines.

TABLEAU VII

NOMENCLATURE DES PRINCIPAUX GLYCOSPHINGOLIPIDES CELLULAIRES SELON HAKOMORI ET KANNAGI [30].

Classes	Abbreviation	Trivial name	Structure	
Simple basic structures	GlcCer*	GlucosylCer	Glcβ1→1Cer	
	GalCer*	GalactosylCer	Galβ1→1Cer	
	FucCer*	FucosylCer	Fucal→1Cer	
	LacCer*	LactosylCer	Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
Globo series	Gb ₃ *	GlobotriaosylCer	Galα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	Gb ₄ *	Globoside	GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	Gb ₅ *	Forsman	GalNAcα1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
Lacto series	Lc3*	LactotriaosylCer	GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	Lc4*	LactotetraosylCer	Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	nLc4*	LactoneotetraosylCer (paragloboside)	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	nLc6*	LactonohexaosylCer	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	nLc8*	LactonooctaosylCer	Galβ1→4GlcNAcβ1→4Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	X†	Lactofucopentaosyl(III)Cer	Galβ1→4[Fuca1→3]GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	Le*†	Lactofucopentaosyl(II)Cer	Galβ1→3[Fuca1→4]GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	H ₁ †	Lactofucopentaosyl(IV)Cer	Fuca1→2Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	H ₂ †	—	Fuca1→2Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	H ₃ †	—	Fuca1→2Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	—	Sialosyl paragloboside	SA2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
	—	Type 1 chain (as in Lc4, Le*)	Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→R	
	—	Type 2 chain (as in nLc4, nLc6, X, H ₁ , H ₂ , H ₃)	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→R	
	Ganglio series	Gg ₃ *	Asialo GM ₂	GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
		Gg ₄ *	Asialo GM ₁	Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
GM ₁ ‡		Hematoside	SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GM ₂ ‡		—	GalNAcβ1→4[SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GM _{1a} ‡		—	Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GM _{1b} ‡		—	SA2→3Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GD ₁ ‡		—	SA2→8SA2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GD _{1a} ‡		—	SA2→3Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GD _{1b} ‡		—	Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→8SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GT ₁ ‡		—	SA2→8SA2→3Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GT _{1a} ‡		—	SA2→3Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→8SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
GQ ₁ ‡		—	SA2→8SA2→3Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→8SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
FucGg ₄ *		Fucosyl asialo GM ₁	Fuca1→2Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer	
FucGM ₁ ‡		Fucosyl GM ₁	Fuca1→2Galβ1→3GalNAcβ1→4[SA2→3]Galβ1→4Glcβ1→1Cer	

** , abbreviations are modified from those recommended by the Nomenclature Committee, International Union of Pure and Applied Chemistry

TABLEAU VIII

Modifications des glycannes des glycosphingolipides associées à la transformation maligne (HAKOMORI [118])

A. synthèse incomplète avec ou sans accumulation de précurseurs

- Type 1 - Absence ou diminution du taux de G_{M3} , G_{D3}
Augmentation du taux de LacCer ou GlcCer

- Type 2 - Absence ou diminution du taux de G_{M1} , G_T , G_{D1a} ou G_{D1b}
Augmentation du taux de G_{M3} , G_{M2}

- Type 3 - Absence ou diminution du taux de G_{b4} , G_{b5}

- Type 4 - Accumulation de globosides G_{b4} ou G_{b5} ou de paragloboside (nLc_4), absents dans les cellules normales

- Type 5 - Accumulation des gangliosides G_{D3} ou G_{D2}

B. Synthèse de nouveaux glycosphingolipides.

- Type 6 - Expression de l'antigène de Forssman (G_{b5})

 - Type 7 - Expression de nouveaux antigènes de groupe sanguin différents de ceux de l'hôte

 - Type 8 - Elongation linéaire des chaînes de type 2 associée à une fucosylation en (α 1-3) de chaque résidu de N-acétylglucosamine

 - Type 9 - Synthèse augmentée de l'haptène x et de sa forme sialylée

 - Type 10 - Synthèse augmentée de l'haptène Le^a et de sa forme sialylée
-

Cependant, jusqu'à présent, très peu d'antigènes glycolipidiques représentent le produit spécifique d'un type de tumeur : l'antigène à activité de groupe A apparaissant dans certains cancers gastro-intestinaux de sujets appartenant au groupe O ou B (YOKOTA et al. [218]), l'expression de l'antigène de FORSSMAN dans des tumeurs de sujets FORSSMAN-négatif (YOUNG et al. [219]) ou l'apparition de l'antigène P₁ dans des tumeurs de sujets P (KANNAGI et al. [220]) représentent quelques exemples de ces antigènes hautement spécifiques. Généralement, la plupart des nouveaux antigènes glycolipidiques sont bien présents dans les tissus normaux correspondants, mais à l'état cryptique et immunologiquement non détectables.

De plus, l'expression de ces antigènes glycolipidiques à la surface cellulaire dépend de leur concentration, de leur association avec d'autres glycolipides ou glycoprotéines, ainsi que de la céramide contrôlant leur intégration et leur orientation dans la membrane (URDAL et HAKOMORI [221], HAKOMORI [205]).

L'immunogénicité des membranes peut donc être contrôlée par des modifications structurales ou conformationnelles de leurs glycosphingolipides.

La figure 17 (p.67), empruntée à HAKOMORI [205], résume l'expression des antigènes glycolipidiques à la surface des cellules tumorales.

B - Modifications des glycanes des glycoprotéines membranaires associées à la transformation maligne.

Cinq types de modifications structurales peuvent affecter les glycanes des glycoprotéines membranaires lors de la transformation maligne (voir les revues de WARREN et al. [222], ATKINSON et HAKIMI [223], NICOLSON [224], YOGESWARAN [225], SMETS et VAN BEEK [226], HAKOMORI [118], READING et HUTCHINS [213]).

1 - Synthèse modifiée des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires.

a - Modification quantitative affectant les glycanes de type N-acétyllactosaminique : la polyantennarisation des glycanes

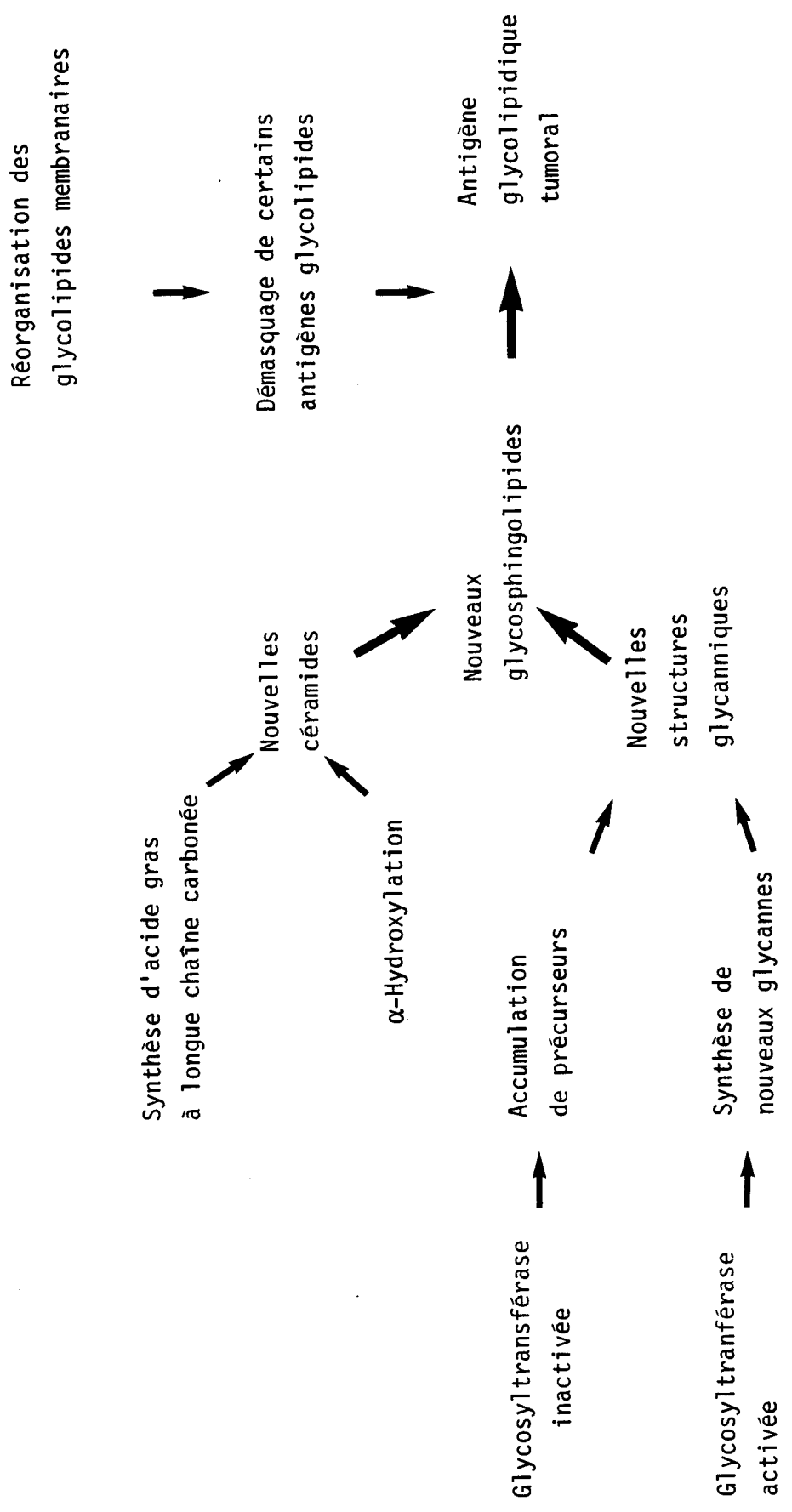


Fig. 17. Mécanismes permettant l'expression de nouveaux antigènes glycolipidiques à la surface des cellules tumorales selon HAKOMORI [205].

L'altération la plus caractéristique associée à la transformation maligne est l'augmentation du nombre de résidus de N-acétyllactosamine branchés sur le noyau pentasaccharidique. Les publications N°10 et 11 mettent en évidence ce phénomène au niveau des glycoprotéines membranaires de fibroblastes de rein de Hamster transformés par le virus du sarcome du Hamster, ainsi qu'au niveau des glycannes d'une glycoprotéine particulière synthétisée par ces cellules : la fibronectine. Ce type de modification a également été mis en évidence au niveau des glycannes des glycoprotéines membranaires de 7 lignées de cellules uro-épithéliales humaines (publication N°12, p.283).

α- Mise en évidence du phénomène.

Une augmentation du poids moléculaire des glycopeptides cellulaires associée à la transformation maligne des cellules fut décrite pour la première fois en 1969 par le groupe de ROBBINS (MEEZAN et al. [227]) grâce à une étude comparée des glycopeptides de fibroblastes de souris 3T3 normaux et transformés par le virus SV40.

Comme dans la plupart des travaux ultérieurs, la méthodologie était la suivante :

- Marquage métabolique des cellules, pendant la phase exponentielle de croissance, à l'aide de glucosamine marquée au tritium ou au carbone 14.

- Fractionnement cellulaire et hydrolyse pronasique des glycoprotéines membranaires des fractions nucléaire, mitochondriale, membranes plasmiques et membranes du reticulum endoplasmique.

- Analyse par co-chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G50 des glycopeptides obtenus à partir de chaque fraction cellulaire de cellules normales et transformées, marqués les uns par la glucosamine tritiée, les autres par la [¹⁴C] glucosamine.

La figure 18 montre le profil de séparation obtenu par chromatographie sur Sephadex G50 des glycopeptides provenant de la fraction cellulaire enrichie en membranes plasmiques. 4 familles de glycopeptides sont ainsi obtenues :

- Un pic 1 exclu correspondant à des glycoprotéines non digérées

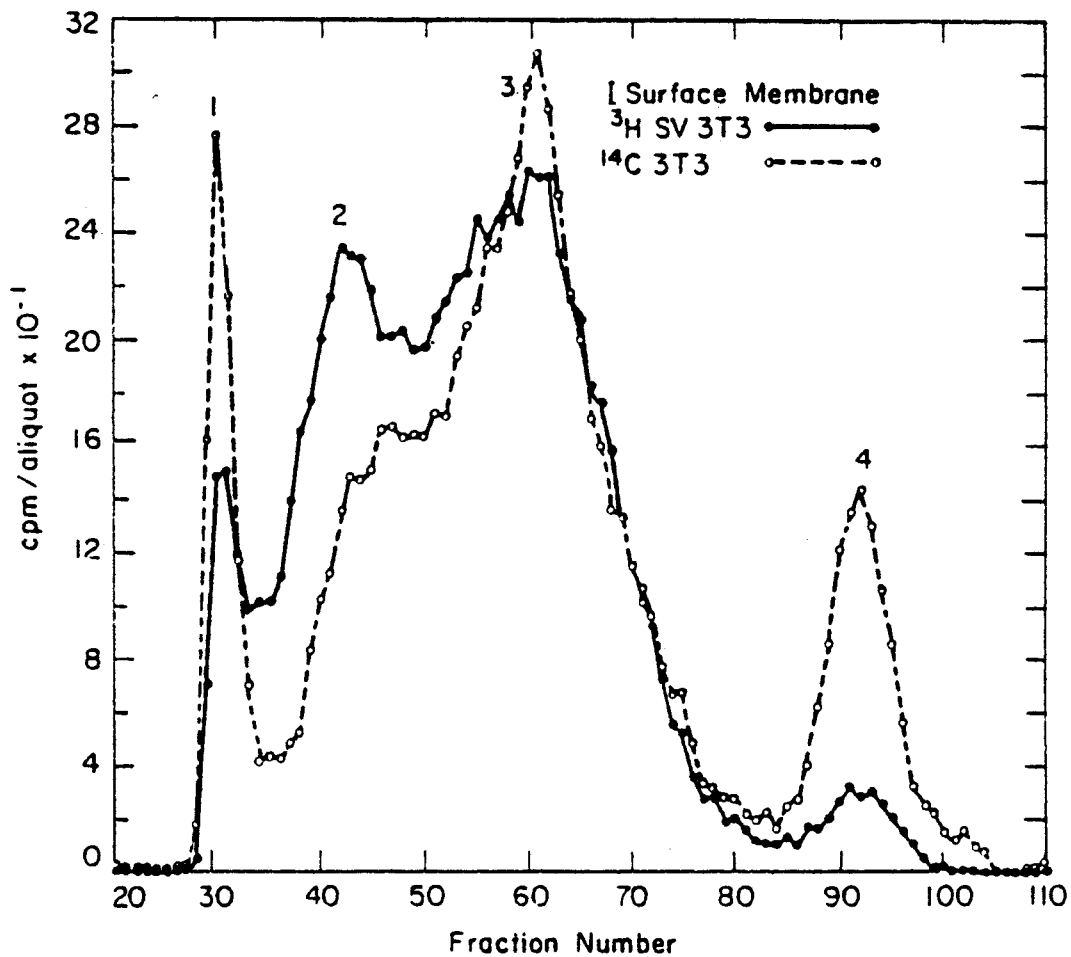


Fig. 18. Profils d'élution de glycopeptides pronasiques de membranes plasmiques de fibroblastes 3T3 normaux (○) ou transformés (●), cultivés en présence de [^3H] ou [^{14}C] glucosamine, sur une colonne de Séphadex G50 (selon MEEZAN et al. [227]).

par la pronase ou à des glycopeptides de haut poids moléculaire.

- Une fraction 2 correspondant à des glycopeptides lourds, plus importante dans les cellules transformées que dans les cellules normales.

- Une fraction 3 correspondant à des glycopeptides légers, plus importante dans les cellules normales que dans leurs homologues transformées.

- Un pic 4 correspondant à des glycopeptides encore plus légers.

Le même type de profil d'élution est obtenu lorsque les glycopeptides provenant des glycoprotéines membranaires nucléaires, mitochondriales ou du réticulum endoplasmique sont analysés de la même façon.

β - Démonstration de relations entre la présence de ces glycopeptides de haut poids moléculaire à la surface d'une cellule et son pouvoir oncogène.

Ces observations du groupe de ROBBINS furent le point de départ de nombreuses comparaisons du même type entre diverses cellules normales et transformées.

La figure 19 montre le profil obtenu par le groupe de WARREN (BUCK et al. [228]) par le protocole suivant :

- libération des glycopeptides par hydrolyse trypsique ménagée de fibroblastes de rein de hamster normaux et transformés par le virus du sarcome de Rous.

- hydrolyse pronasique exhaustive de ces glycopeptides.

- co-fractionnement par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G50.

Comme précédemment, 4 fractions sont obtenues dont la composition a été précisée :

- Un pic exclu correspondant à des protéoglycannes et à des glycopeptides liés O-glycosidiquement, non digérés par la pronase.

- Une fraction A correspondant à des glycopeptides sialylés et fucosylés de poids moléculaire apparent 4 600. Les cellules transformées renferment plus de glycopeptides de ce type ("fast eluting glycopeptides") que les cellules normales.

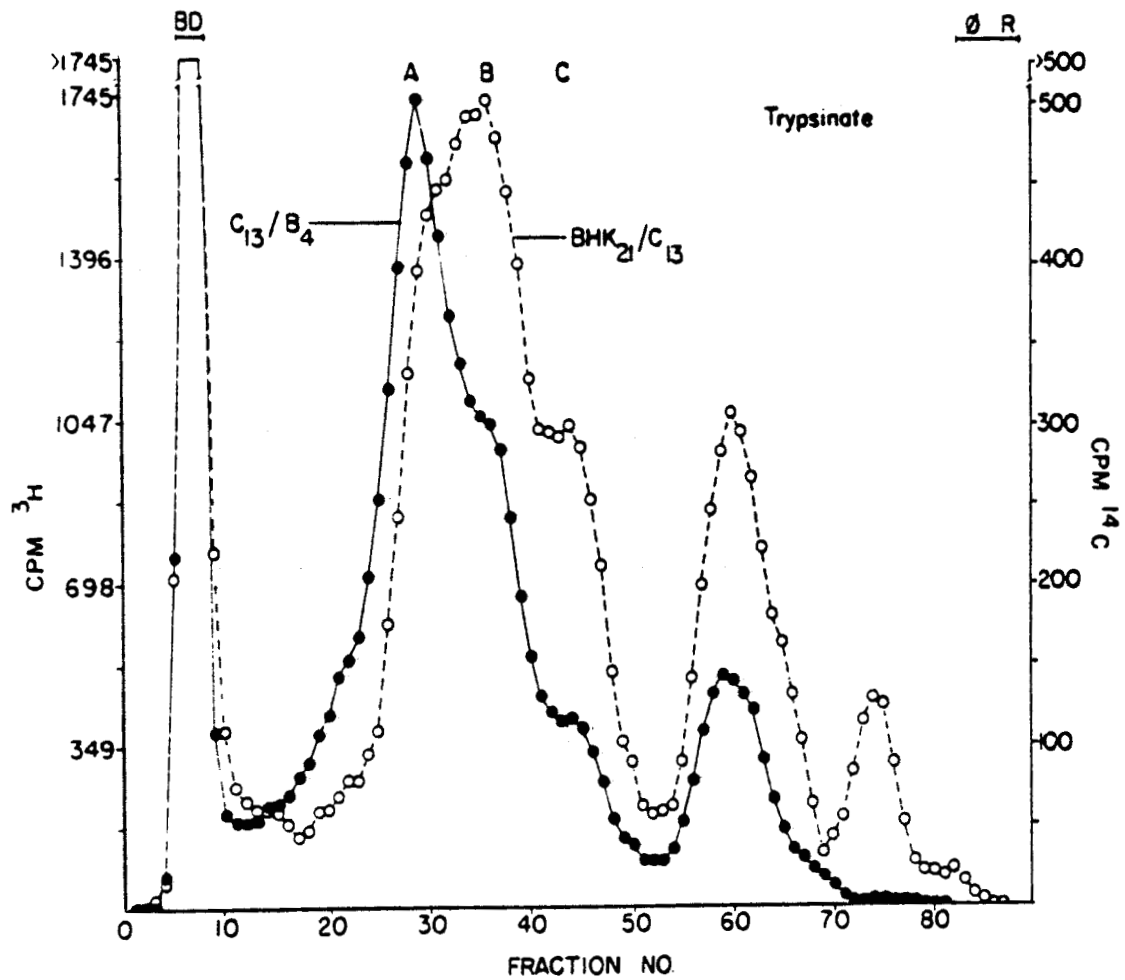


Fig. 19. Profils d'élution de glycopeptides pronasiques de fibroblastes BHK normaux (O) ou transformés (●) cultivés en présence de [³H] ou [¹⁴C] glucosamine, sur une colonne de Séphadex G50 (selon BUCK et al. [228]).

- Une fraction B correspondant à des glycopeptides sialylés et fucosylés plus légers que les précédents (poids moléculaire 3 800).

- Une fraction C renfermant des glycopeptides de type oligomannosidique (poids moléculaire 1 500).

WARREN et al. [229] ont ensuite démontré que l'augmentation du poids moléculaire des glycopeptides de la fraction A par rapport à ceux de la fraction B résidait partiellement dans leur plus grande sialylation, car cette différence de poids moléculaire s'atténue lorsque les glycopeptides de la fraction A sont soumis à l'action d'une sialidase ou à une hydrolyse acide ménagée.

A l'aide de glycopeptides endogènes désialylés, les mêmes auteurs ont, d'autre part, mis en évidence, dans les cellules transformées, une activité sialyltransférase 2,5 à 11 fois supérieure à celle des cellules normales.

Quel que soit le type cellulaire étudié et l'agent transformant, cette augmentation de poids moléculaire de certains glycanes ainsi que leur hypersialylation semblent constantes.

Les glycopeptides préparés à partir des glycoprotéines membranaires des noyaux, mitochondries, lysosomes et du reticulum endoplasmique des cellules transformées présentent aussi ces modifications (BUCK et al. [230]). On les retrouve, à la fois, dans les cellules transformées cultivées *in vitro* ou *in vivo*, dans les tumeurs (ATKINSON et BRAMWELL [231, 232]). Ces glycopeptides sont également présents à la surface de leucocytes humains préleucémiques ou prélevés à un stade précoce de la maladie. A ce titre, leur recherche, à la surface des lymphocytes humains aurait valeur de diagnostic (VAN BEEK et al. [233]).

On les retrouve, enfin, chez des cellules transfectées par de l'ADN de neuroblastomes (SANTER et al. [234]) ou de cellules uro-épithéliales cancéreuses humaines (COLLARD et al. [235]) et l'expression à la surface cellulaire de ces glycanes de haut poids moléculaire semble bien nécessaire à l'expression phénotypique de la transformation, car des cellules transfectées par des ADN oncogènes, puis traitées par la swainsonine, un inhibiteur de la maturation des glycanes liés N-glycosidiquement, sont incapables de se multiplier en milieu gélifié (DE SANTIS et al. [236]).

Il existe donc une relation très étroite entre la présence de ces glycanes de haut poids moléculaire à la surface d'une cellule et son pouvoir oncogène. Cependant, indépendamment de la transformation maligne, leur présence à la surface cellulaire semble être associée également à la croissance cellulaire. En effet, des cellules normales en phase exponentielle de croissance en expriment plus que les mêmes cellules en phase stationnaire de croissance (BUCK et al. [237]).

- Mise en évidence de la polyantennarisation des glycanes de type N-acétyllactosaminique des N-glycosylprotéines membranaires associée à la transformation maligne.

En 1976, OGATA et al. [238], sur la base du comportement sur Concanavalline A immobilisée des glycopeptides de haut poids moléculaire isolés de cellules transformées, et après action d'exoglycosidases et d'endoglycosidases, ont montré que l'alourdissement de ces glycopeptides résultait non seulement d'une hypersialylation, mais aussi de l'addition de résidus supplémentaires de N-acétyllactosamine sur le noyau pentasaccharidique, conduisant à la formation de glycanes tétraantennés.

BLITHE et al. [239] démontrèrent ensuite que des fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous étaient également enrichis en glycopeptides tri- ou tétraantennés non reconnus par la Concanavalline A, par rapport aux fibroblastes normaux. Ces auteurs précisèrent que ces différences étaient d'ordre quantitatif et non qualitatif.

Sur la base du comportement électrophorétique des glycanes membranaires libérés pour hydrazinolyse, à partir de fibroblastes de rein de Hamster normaux et transformés, TAKASAKI et al. [240] suggèrent ensuite des différences d'ordre qualitatif avec l'apparition dans les cellules transformées de glycanes penta- et hexaantennés.

Cependant, sur la base d'études structurales plus précises, le groupe de KOBATA (YAMASHITA et al. [89]) revint sur ces résultats et démontra que l'on retrouvait les mêmes structures glycaniques dans les deux lignées cellulaires, mais avec une augmentation nette des structures tétraantennées et poly-N-acétyllactosaminiques chez les fibroblastes transformés (Fig. 20). Cette augmentation est associée à

Fraction		BHK (% molar ratio)	Py-BHK (% molar ratio)
N	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \end{array} \right. \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{OT}$	34.5%	25.7%
I	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array}$	25.7%	22.9%
II	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array}$ $\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array}$	9.9%	4.0%
III	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array}$	5.4%	14.1%
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array} \right.$	2.3%	3.3%
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array} \right.$		
Fraction			
IV to VII			
	$(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)_m \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array} \right.$		
	$(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)_n \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array} \right.$		
	$(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)_n \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{R} \end{array} \right.$		
IV	m=1 n=2	4.7%	6.3%
V	m=2 n=3	3.9%	5.0%
VI	m=3 n=4	2.9%	4.0%
VII	not determined	7.4%	8.9%

:Fucal
↓
6

R=Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc_{OT}

Fig. 20. Structures des glycanes membranaires de cellules BHK normales et transformées par le virus du polyome et leur pourcentage relatif dans chaque type cellulaire selon YAMASHITA *et al.* [89].

une activité plus élevée de la N-acétylglucosaminyltransférase V chez les fibroblastes transformés (YAMASHITA et al. [241]).

Cette polyantennarisation fut confirmée récemment par PIERCE et ARANGO [242], dans le même système cellulaire, mais ces auteurs ne trouvèrent pas de différences significatives au niveau du taux de sialylation des glycanes liés N-glycosidiquement.

La polyantennarisation semble donc constituer un marqueur tumoral caractéristique, dans de très nombreux modèles cellulaires in vitro ainsi que dans les tumeurs in vivo. Cependant, il faut signaler que dans des cas d'hépatite virale ou de cirrhose, DEBRUYNE et al. [243] ont observé, sur la sérotransferrine humaine, une augmentation du taux de glycanes triantennés au détriment des glycanes biantennés. Cette observation peut correspondre à un stade précoce de transformation maligne du tissu hépatique et, à ce titre, la recherche de ces variants de sérotransferrine riches en glycanes triantennés, par la technique d'immuno-affino-électrophorèse croisée, aurait valeur de diagnostic. D'autre part, le même phénomène a été mis en évidence lors de la grossesse (G. SPIK, communication personnelle), mais, là encore, le fœtus ne pourrait-il pas être considéré comme une "tumeur maligne" en train de se développer échappant comme elle, notamment à la surveillance immunitaire de l'hôte.

b - Modifications quantitatives et qualitatives affectant les glycanes de type oligomannosidique.

Comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre II, p.58) les membranes des cellules présentant une croissance cellulaire active ou les cellules transformées sont enrichies en glycanes de type oligomannosidique plus "lourds" (CECCARINI et al. [198], MURAMATSU et al. [199]). Cependant, ce phénomène semble refléter une croissance cellulaire plus active plutôt que l'expression du pouvoir tumorigène des cellules transformées.

c - Modifications qualitatives affectant les glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Nous venons de voir que lors de la transformation maligne, les

modifications affectant les glycanes des N-glycosylprotéines membranaires sont essentiellement d'ordre quantitatif, les mêmes glycanes existant sur les deux types cellulaires mais dans des proportions différentes.

Cependant, dans certaines tumeurs, de nouvelles structures glycaniques font leur apparition. YAMASHITA et al. [244] ont ainsi montré que dans la γ -glutamyltranspeptidase de foie de Rat hépatomateux, 40 p. 100 des glycanes sont représentés par des glycanes biantennés possédant un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire. Ces glycanes sont absents de la γ -glutamyltranspeptidase isolée du foie de Rat normal (Fig. 21, p.77).

Des différences qualitatives ont également été retrouvées dans des glycoprotéines de sécrétion. La gonadotrophine chorionique est une hormone glycoprotéinique sécrétée dans le sang et l'urine de femmes enceintes, mais également chez les sujets atteints de choriocarcinomes. MIZUOCHI et al. [245] ont montré que la gonadotrophine tumorale renfermait 5 glycanes n'existant pas dans la gonadotrophine normale (Fig. 22. p.78).

Enfin, la transformation maligne peut se traduire également par une synthèse incomplète de certains glycanes membranaires : YAMASHITA et al. [244] ont démontré que la γ -glutamyltranspeptidase d'hépatome de Rat renfermait des glycanes de type N-acétyllactosaminique incomplets que l'on ne retrouve pas dans l'enzyme de foie de Rat normal (Fig. 21, p.77). Ces glycanes incomplets constituent, à ce titre, des déterminants antigéniques caractéristiques.

Dans le futur, l'apport de nouvelles techniques de fractionnement alliées à une sensibilité accrue de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton à 600 MHz devrait permettre d'identifier, à la surface de certaines cellules cancéreuses, de nouvelles structures glycaniques antigéniques.

2 - Modifications des séquences oligosaccharidiques périphériques des glycanes des glycoprotéines et des glycolipides associées à la transformation maligne.

De nombreux déterminants antigéniques, à activité de groupe

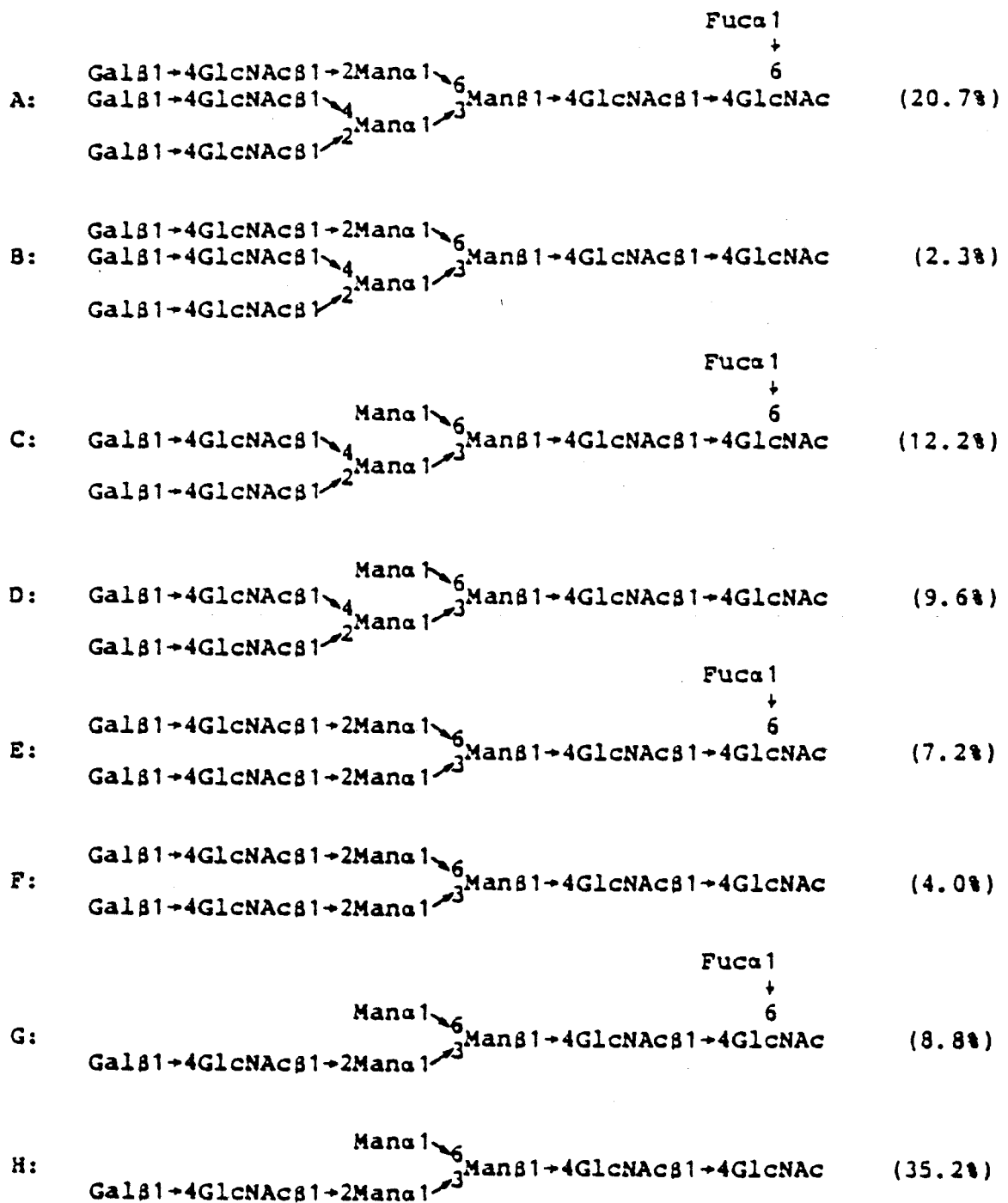


Fig. 22. Structures et pourcentage relatif des glycanes de la gonadotrophine chorionique tumorale humaine selon MIZUOCHI *et al.* [245].

sanguin, associés aux tumeurs appartiennent à la fois aux glycolipides ou aux glycoprotéines membranaires et résultent souvent de l'extension de la fucosylation ou de la sialylation (p. 80) de glycannes préexistants dans les cellules normales. La figure 23 (p. 80) présente les structures de quelques uns de ces antigènes.

L'antigène X ou antigène SSEA-1 (SOLTER et KNOWLES [246]) ou Lewis^X (HAKOMORI et al. [247]) a été identifié dans des glycoprotéines de neuroblastomes humains (SANTER et al. [248]), dans les antigènes carcino-embryonnaires (CHANDRASEKARAN et al. [249]) ou dans des glycolipides d'adénocarcinomes (MAGNANI et al. [250]). Toutefois, on le retrouve aussi associé à des glycoprotéines de sécrétion de tissus sains, en particulier dans la lactotransferrine humaine (SPIK et al. [85]) et dans l'orosomucoïde.

Le dérivé sialylé de l'haptène X ou sialyl Lewis^X (Fig. 23, p.80) a été caractérisé dans l'orosomucoïde de patients atteints de métastases hépatiques (CHANDRASEKARAN et al. [251]), dans des mucines amniotiques (HANNISH et al. [252]) ou associé aux glycannes de type poly-N-acétyllactosaminique des glycoprotéines de granulocytes humains normaux (FUKUDA et al. [90]). On retrouve aussi cet antigène dans des structures de type poly-N-acétyllactosaminique glycolipidiques di- ou trifucosylées s'accumulant dans des adénocarcinomes humains (HAKOMORI et al. [253]).

Un autre exemple d'antigène glycannique est l'antigène 19.9 ou sialyl Lewis^a (Fig. 23, p.80) isomère structural du sialyl Lewis^X, identifié dans les cellules cancéreuses du colon (MAGNANI et al. [254]). Cet antigène sialylé a également été décelé dans des glycoprotéines gastriques de type mucine (MAGNANI et al. [255]). Ces antigènes tumoraux sialylés, sialyl Lewis^X et sialyl Lewis^a, bien que retrouvés dans quelques tissus sains, sont également libérés dans la circulation en grande quantité (SEARS et al. [256]). Leur détection dans le sang devrait permettre d'évaluer l'importance de la tumeur.

Une autre modification associée à la transformation maligne semble également liée à l'apparition de glycannes de type poly-N-acétyllactosaminique linéaires ou branchés. La présence de ces glycannes a été démontrée dans des glycoprotéines membranaires de

ANTIGENE	STRUCTURE	IMMUNOGENE
TYPE 1		
FC10.2	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc	Embryonal carcinoma
A	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc 1,2 Fuca	Epidermal carcinoma
Le ^a	Gal β 1-3GlcNAc 1,4 Fuca	Colon carcinoma
Le ^b	Gal β 1-3GlcNAc 1,2 1,4 Fuca Fuca	Colon carcinoma
ALe ^b	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc 1,2 1,4 Fuca Fuca	Epidermal carcinoma Colon carcinoma
19.9 sialosyl- Le ^a	Gal β 1-3GlcNAc 2,3 1,4 NeuAc α Fuca	Colon carcinoma
TYPE 2		
Lactosyl ceramide	Gal β 1-4Glc-Cer	Nonlymphoblastic leukaemia
H	Gal β 1-4GlcNAc 1,2 Fuca	Embryonal carcinoma
A	GalNAc α 1-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc 1,2 Fuca	Epidermal carcinoma
B	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc 1,2 Fuca	Pancreatic carcinoma
SSEA-1 Le ^a	Gal β 1-4GlcNAc 1,3 Fuca	Myelomonocytic leukaemia Epidermal carcinoma Colon carcinoma
Cl4 Le ^a	Gal β 1-4GlcNAc 1,2 1,3 Fuca Fuca	Colon adenoma Lung carcinoma Gastric carcinoma Embryonal carcinoma Epidermal carcinoma
ALe ^a	GalNAc α 1-3Gal β 1-4Glc/GlcNAc 1,2 1,3 Fuca Fuca	Colon carcinoma
CSLEX1 Sialosyl- Le ^a	Gal β 1-4GlcNAc 2,3 1,3 NeuAc α Fuca	Gastric carcinoma
TYPE 3		
H	Gal β 1-3GalNAc 1,2 Fuca	Breast carcinoma
SSEA-4	Gal β 1-3GalNAc 2,3 NeuAc α	Embryonal carcinoma

Fig. 23. Déterminants antigéniques tumoraux à activité de groupe sanguin caractérisés à la fois dans des glycolipides ou des glycoprotéines (FEIZI [106]).

cellules du carcinome embryonnaire murin F9 (MURAMATSU et al. [257]) et diverses cellules leucémiques (CUMMINGS et KORNFELD [258]).

3 - Modifications structurales affectant les glycanes des O-glycosylprotéines membranaires lors de la transformation maligne.

D'autres modifications peuvent affecter également les glycanes des O-glycosylprotéines membranaires lors de la transformation maligne.

L'antigène de THOMSEN-FREIDENREICH (antigène T) et l'antigène Tn (voir Tableau I, p.23) semblent toujours présents dans les carcinomes primaires ou secondaires alors qu'ils sont absents des tissus sains (SPRINGER [109]).

Des sialoglycoprotéines très riches en glycanes liés O-glycosidiquement ont été mises en évidence également dans un grand nombre de tumeurs. L'antigène CA, identifié par l'anticorps monoclonal CA-1 réagit avec des glycoprotéines de 390 et 350kD présentes chez de nombreuses cellules malignes. L'antigène renferme la séquence Gal (β 1-3) GalNAc (antigène T), mais l'antigénicité CA nécessite à la fois la présence d'acide sialique et d'une séquence peptidique (WISEMAN et al. [259]).

L'apparition de glycanes liés O-glycosidiquement dans des glycoprotéines membranaires de cellules de l'hépatome ascitique de Rat AH 66 constitue une modification majeure liée à la transformation maligne, car les membranes de foie normal ou en régénération ne renferment pas de tels glycanes (AKASAKI et al. [260]).

L'analyse des glycanes de différentes lignées cellulaires ascitiques d'adénocarcinomes de Souris 13762 met en évidence des structures branchées, possédant une activité de groupe sanguin B ainsi qu'un déterminant de groupe B sialylé (HULL et al. [261]). Rappelons également que CODINGTON et al. [55] ont isolé à partir des cellules ascitiques TA₃ HA, une glycoprotéine très riche en glycanes liés O-glycosidiquement, l'épiglycanine (voir p.24). Ces O-glycosylprotéines ("mucin-like") semblent donc être plus abondantes à la surface

des cellules cancéreuses, en particulier dans les tumeurs ascitiques et, comme le suggèrent SANDFORD et al. [262], leur rôle serait de masquer certains antigènes de surface, en particulier les antigènes d'histocompatibilité.

II - Conséquences biologiques possibles des modifications des glycoconjugués de la surface cellulaire observées lors de la transformation maligne.

La figure 24, empruntée à ROBBINS et NICOLSON [263], résume les principales modifications pouvant affecter la cellule et, plus particulièrement, sa surface après transformation maligne. Il faut cependant signaler qu'elles concernent surtout les cellules d'origine fibroblastique cultivées et transformées in vitro.

A - Modifications de la morphologie cellulaire.

Les cellules transformées présentent une morphologie particulière lorsqu'on les observe au microscope électronique à balayage. Les cellules normales interphasiques apparaissent étalées sur leur substrat et possèdent une surface cellulaire lisse (Fig. 25 B, p.84) ; les cellules transformées, ainsi d'ailleurs que les cellules normales en mitose, ont une forme sphérique et présentent de nombreuses microvillosités à leur surface (Fig. 25 A, p.84). Cette forme sphérique explique le peu d'adhésivité présentée par les cellules transformées pour leur substrat et traduit de profondes modifications du cytosquelette associé à la membrane : les quantités d'actine ou de myosine sont plus faibles dans les cellules transformées que dans les cellules normales et le réseau de microfilaments semble désorganisé.

Cette morphologie cellulaire différente peut également être la conséquence des modifications survenues au niveau des glycolipides membranaires, car ces derniers contrôlent à la fois la rigidité et la fluidité de la membrane de surface. Rappelons, à cet égard, que les cellules transformées sont agglutinées par certaines lectines à des concentrations beaucoup plus faibles que les cellules normales (Fig. 26., p.86) (AUB et al. [6]).

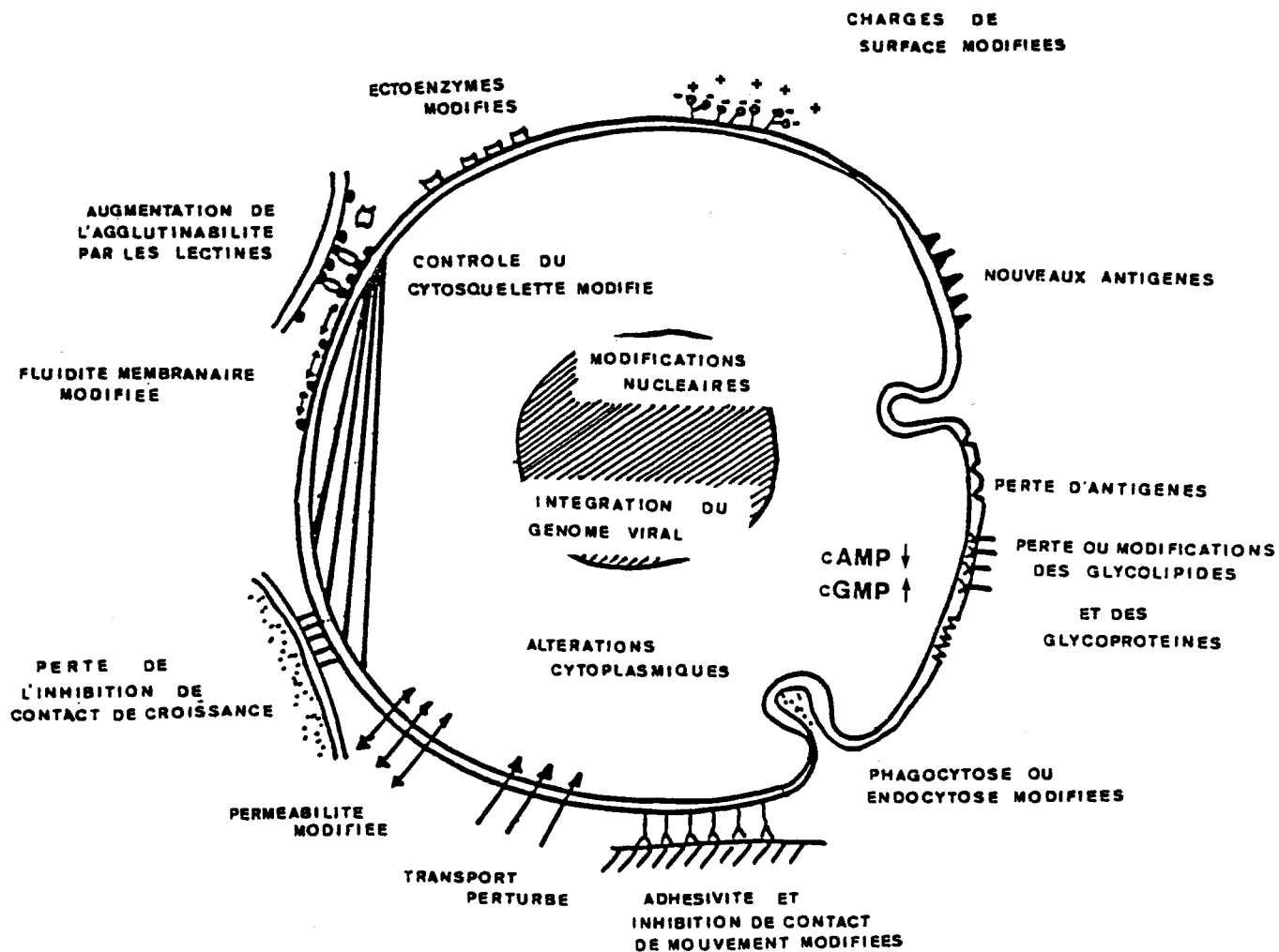


Fig. 24. Principales modifications affectant la cellule après transformation maligne selon ROBBINS et NICOLSON [263].

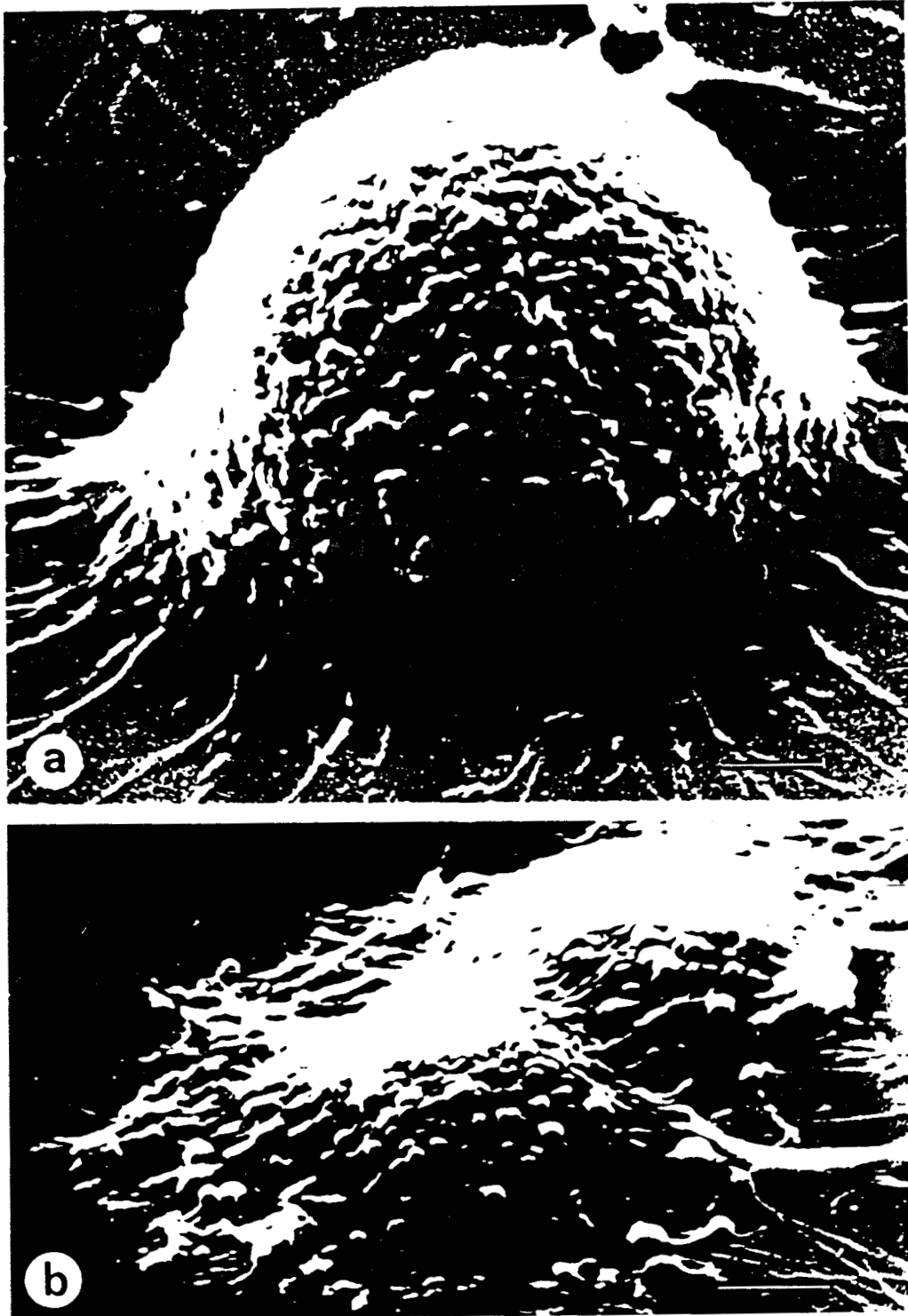


Fig. 25. Morphologie d'un fibroblaste de rein de Hamster normal (b) et de son homologue transformé par le virus du sarcome du Hamster (a), observés au microscope électronique à balayage (selon TORPIER [16]).

Cette augmentation de l'agglutinabilité n'est pas due à une augmentation du nombre de sites récepteurs pour la lectine, mais à leur mobilité accrue chez les cellules transformées. Ceci semble refléter une plus grande fluidité de la membrane cancéreuse par rapport à la membrane normale.

D'autre part, la transformation maligne s'accompagne d'une perte ou d'une diminution de synthèse des fibronectines (voir à ce sujet la revue de ALITALO et VAHERI [264]). Or, ces fibronectines jouent un rôle important dans l'organisation du cytosquelette, donc dans le maintien de la morphologie cellulaire. L'apport de fibronectine exogène permet de restaurer la morphologie et de l'étalement des cellules transformées sur leur substrat (YAMADA et al. [265]).

B - Modifications de l'adhésivité cellulaire.

Les cellules transformées se caractérisent par une adhésivité intercellulaire et vis-à-vis du substrat réduites (COMAN [266], GAIL et BOONE [267]). Cette propriété est à rapprocher de la facilité avec laquelle les cellules cancéreuses peuvent métastaser (NICOLSON et WINKELHAKE [268]). La diminution de l'adhésivité cellulaire peut correspondre également à la propriété acquise par certaines cellules transformées de se multiplier sur milieux gélifiés ("anchorage independent cell growth") (MONTAGNIER et MACPHERSON [269]). Cette propriété est d'ailleurs considérée comme étant l'un des meilleurs indicateurs de la transformation maligne. Dans ces phénomènes d'adhésion, les glycoprotéines membranaires, les fibronectines, la vinculine et l'actinine du cytosquelette sont impliquées de façon très étroite (CHEN et SINGER [270]). Or nous avons vu que les fibronectines étaient profondément modifiées lors de la transformation maligne. D'autre part, la biosynthèse des glycannes des glycolipides et des glycoprotéines, récepteurs membranaires potentiels de ces fibronectines, est également perturbée. Ceci peut expliquer pourquoi les possibles interactions entre :

- lectines membranaires ou solubles/glycannes des glycoprotéines de structure des matrices extracellulaires,
- lectines membranaires ou solubles/glycannes de la surface cellulaire,

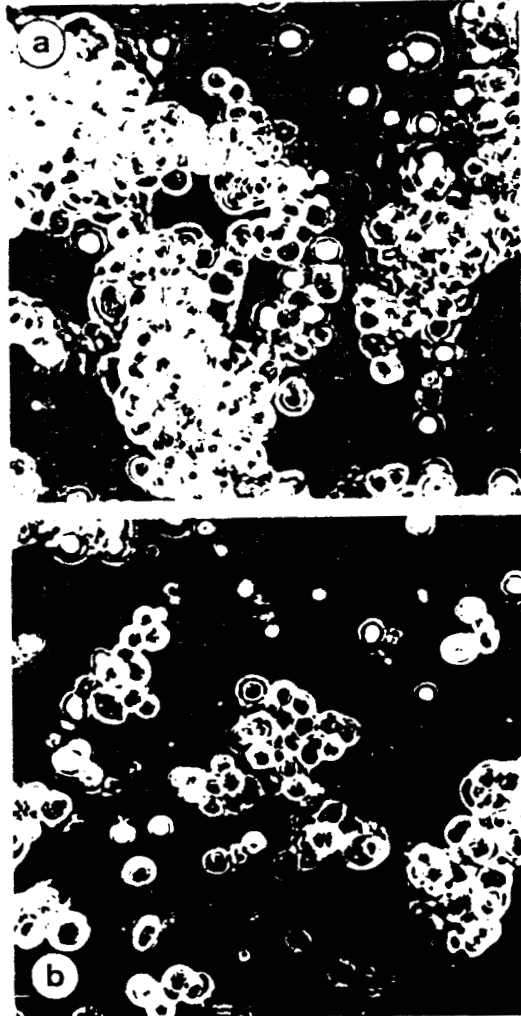


Fig. 26. Les fibroblastes de rein de hamster transformés par le virus du sarcome du Hamster (a) sont agglutinés par la Concanavaline A à une concentration beaucoup plus faible (25 $\mu\text{g/ml}$) que les fibroblastes normaux (100 $\mu\text{g/ml}$) (b) (TORPIER [16]).

- glycoprotéines de structure des matrices extracellulaires/
glycoconjugués de la surface cellulaire,
peuvent être modifiées et conduire à la diminution de l'adhésivité
cellulaire.

C - Abolition des systèmes de contrôle de la croissance
cellulaire.

Nous rappellerons simplement le rôle potentiel attribué aux
glycannes des glycoprotéines ou des glycolipides dans le phénomène
d'inhibition de contact de croissance (voir p.58 et 59), en
particulier, la relation très étroite entre la diminution du taux des
gangliosides GM1 et GM3, la phosphorylation de résidus de tyrosine des
récepteurs de facteurs de croissance et la perte de l'inhibition de
contact de croissance.

D - Perturbation de la perméabilité membranaire et des
transports actifs.

Depuis les premières observations de WARBURG [271], de nombreuses
études ont montré que les cellules cancéreuses présentaient une
activité respiratoire ainsi qu'une absorption et un métabolisme du
glucose plus intenses que les cellules normales. La vitesse de
transport du glucose ou d'autres petites molécules (acides aminés,
etc....) augmente chez la cellule transformée (PARDEE [272]) et
représente un des marqueurs caractéristiques de la transformation
maligne (HATANAKA [273], DARNELL et al. [274]). Or, nous avons vu
comment les glycannes de surface cellulaire (voir p.48) pouvaient
contrôler la perméabilité membranaire. Les modifications de ces
glycannes, lors de la transformation maligne, peuvent donc expliquer
ces perturbations de la perméabilité.

E - Bouleversement des signaux de reconnaissance constitués par
les glycannes des glycoconjugués membranaires.

Au cours de la transformation maligne, les modifications struc-
turales des glycannes des glycoconjugués membranaires peuvent se
traduire par de profondes modifications de leur conformation spatiale.

En ne prenant que ce seul exemple, ceci serait suffisant pour expliquer la dissociation cellulaire provoquée par la non reconnaissance de ces glycanes par les lectines membranaires d'autres cellules du même tissu et, au contraire, leur reconnaissance par des lectines membranaires de cellules appartenant à d'autres tissus, permettant ainsi le développement de foyers métastatiques.

F - Apparition ou réapparition de nouveaux antigènes glycaniques membranaires lors de la transformation maligne.

L'expression ou la réexpression de nouveaux antigènes glycaniques à la surface des cellules tumorales permet à ces dernières d'échapper à la surveillance du système immunitaire (HERBEMAN [275]) et conduit ainsi à la formation de métastases. Certains de ces antigènes sont reconnus par des anticorps monoclonaux, permettant ainsi d'envisager une immunothérapie du cancer par ciblage de drogues ou de toxines conjuguées à ces anticorps.

III - CONCLUSIONS.

Depuis plus de 15 ans, la comparaison de divers tissus sains avec leurs homologues tumoraux ou de différentes lignées cellulaires en culture avant et après transformation par des agents carcinogènes, a permis de montrer que la transformation maligne s'accompagnait toujours de modifications importantes touchant les glycoconjugués de la membrane de surface. Alors que quelques unes de ces modifications ne semblent refléter qu'une croissance cellulaire plus active, d'autres au contraire semblent caractéristiques du phénotype malin, en particulier la polyantennarisation des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires. Nous avons passé en revue les conséquences possibles de ces altérations sur la physiologie et le comportement social des cellules cancéreuses.

Dans différents modèles cellulaires, l'utilisation d'inhibiteurs de la glycosylation a permis de démontrer le rôle important ou potentiel joué par les glycanes des glycoprotéines membranaires. Avec

d'autres modèles, des corrélations ont pu être établies entre les effets biologiques induits par certaines drogues et les modifications des glycanes de la surface cellulaire, bien qu'avec de tels modèles expérimentaux, il soit souvent difficile de définir clairement des relations de cause à effet.

Dans de nombreuses cellules transformées, des variations de l'activité de certaines glycosyltransférases sont responsables de la glycosylation aberrante des glycolipides et glycoprotéines membranaires. Il est, d'autre part, possible que la synthèse des glycanes de ces glycoconjugués soit non seulement contrôlée par la quantité et la spécificité des glycosyltransférases, modulées elles mêmes au niveau de leur expression, mais également par l'organisation dans les membranes de ces assemblées de glycosyltransférases. Cette organisation ainsi que l'activité des glycosyltransférases peuvent, d'autre part, être modifiées par phosphorylation (MCLAWHON et al. [276]) ou glycosylation (IVATT [277]) de ces glycosyltransférases après leur synthèse.

De plus, nous avons vu que la conformation des glycanes pourrait affecter la disponibilité d'un substrat pour les glycosyltransférases ou les glycosidases (SCHACHTER [105]).

A l'époque où nous débutons nos travaux, pratiquement aucune structure de glycanne de glycoprotéine membranaire n'était connue. Nous nous sommes donc attaché à mettre au point des procédés de fractionnement miniaturisés de ces glycanes dans le but de rassembler le maximum d'informations sur leur structure et sur leur conformation afin, d'une part, de mieux comprendre leur rôle et, d'autre part, de mettre en évidence d'éventuelles modifications de leur structure dans les cellules cancéreuses et, plus particulièrement, dans les cellules métastatiques.

* *
* *

TRAVAUX PERSONNELS

oOo

MATERIELS ET METHODES

* *
* *

I - Modèles expérimentaux étudiés.

A - Membranes plasmiques isolées de foie de Rat normal et hépatomateux.

Pour des raisons de commodité et de rendement, nous avons choisi, pour mettre au point nos méthodes de fractionnement des glycanes membranaires, de travailler dans un premier temps sur les membranes plasmiques isolées de foie de Rat normal et hépatomateux. Ces fractions membranaires ont été purifiées par la méthode de NEVILLE [278] modifiée par RAY [279].

1 - Principe.

L'isolement des membranes plasmiques comprend deux parties :

- d'abord la préparation d'une fraction nucléaire grossière,
- puis, la purification des membranes plasmiques présentes dans cette fraction par centrifugation en gradient discontinu de saccharose.

L'originalité de la méthode de RAY réside dans la composition du milieu d'homogénéisation qui renferme du chlorure de calcium 0,5 mM dont le rôle est de stabiliser les structures membranaires au cours de l'homogénéisation.

D'autre part, après homogénéisation, l'homogénat est dilué 100 fois par rapport au volume de foie de départ. L'intérêt de cette dilution est d'abaisser la viscosité de la suspension ; les membranes plasmiques sédimentent ainsi plus facilement à faible vitesse pendant la première partie de leur isolement.

2 - Mode opératoire.

a - Préparation de la fraction nucléaire grossière.

On utilise des rats mâles Wistar âgés de trois mois, sacrifiés après un jeûne de 12 h. Après décapitation, les foies sont prélevés rapidement et placés dans le milieu d'homogénéisation (NaHCO_3 1mM pH

7,5, CaCl_2 0,5 mM) froid. Toutes les opérations ultérieures se déroulent à + 4°C. Les foies (en général au nombre de 3 par purification) sont broyés à l'aide de l'appareil de FISHER. Le broyat est homogénéisé dans 150 ml de milieu à l'aide d'un appareil de POTTER-ELVEJEHM. L'homogénat est ensuite dilué à 2,5 litres avec le milieu d'homogénéisation et filtré sur quatre couches de gaze. Ce filtrat, réparti dans quatre pots métalliques de 650 ml de centrifugeuse MARTIN CHRISS, est centrifugé à 3 200 rpm (2 200 g) pendant 30 mn. Les culots (fraction nucléaire grossière) sont resuspendus dans 50 ml de milieu d'homogénéisation et dilués à 1,25 litre avec le même milieu. L'ensemble est réparti dans deux pots métalliques de 650 ml et centrifugé 15 mn à 2 800 rpm (2 000 g).

Les culots sont resuspendus à nouveau dans 650 ml de milieu d'homogénéisation et la suspension recentrifugée pendant 15 mn à 2 800 rpm.

b - Préparation du gradient discontinu de saccharose

Le dernier sédiment (Fraction nucléaire grossière) obtenue après centrifugation à faible vitesse est resuspendu dans 1 ml de milieu d'homogénéisation et mélangé à 16 ml de saccharose à 70 p. 100 (p:p). Cette suspension est ensuite répartie dans les trois tubes d'un rotor SW25-2 (BECKMAN). On dépose sur cette suspension 16 ml de saccharose à 45 p. 100, puis 20 ml de saccharose à 41 p. 100 et enfin, 8 ml de saccharose à 37 p. 100 (p:p). Les tubes sont soumis à une centrifugation de 2 h à 25 000 rpm (90 000 g) dans une centrifugeuse L-2-65 B (BECKMAN). Après centrifugation, on prélève la fraction membrane plasmique entre les couches de saccharose 41 p. 100 et 37 p. 100, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Après dilution dans le milieu d'homogénéisation, la fraction membranaire est resédimentée à faible vitesse. Cette opération est répétée plusieurs fois de façon à éliminer le saccharose du gradient de centrifugation.

Après prélèvement d'une fraction aliquote destinée aux contrôles de pureté par dosage d'enzymes marqueurs et observation de microscopie électronique, les membranes plasmiques sont lyophilisées.

La préparation de membranes plasmiques à partir d'hépatomes primaires induits par addition de 3'-méthyl-4-diméthylaminobenzène aux aliments des animaux est effectuée selon le même protocole, après élimination des zones de tissus nécrotiques.

c - Contrôle de la pureté des fractions membranaires isolées.

En plus des contrôles systématiques de chaque préparation membranaire par observation au microscope électronique, les activités enzymatiques suivantes ont été mesurées :

- l'activité 5'-nucléotidase, enzyme marqueur des membranes plasmiques est dosée selon la méthode de EMMELOT et al. [280].
- l'activité succinate déshydrogénase, enzyme marqueur des mitochondries est mesurée selon la méthode de BONNER [281].
- l'activité glucose-6-phosphatase, enzyme marqueur des membranes du reticulum endoplasmique est déterminée selon la méthode de RAY [279].

B - Fibroblastes de rein de Hamster nouveau né "normaux" (BHK 21/C13/8) ou transformés par le virus du sarcome du Hamster (BHK21/C13/8/HS5).

Afin d'étudier les modifications des structures glycaniques accompagnant la transformation maligne des cellules, nous avons d'abord choisi le fibroblaste de rein de Hamster (BHK21) n'ayant subi qu'un nombre réduit de passages in vitro, comme cellule de référence et le même fibroblaste, après transformation par le virus oncogène du sarcome du Hamster (BHK21/HS5).

Ces deux lignées cellulaires nous ont été fournies par le Professeur Luc MONTAGNIER (Institut Pasteur, Paris).

La lignée cellulaire permanente de fibroblastes de rein de Hamster BHK21 a été isolée en 1962 par MAC PHERSON et STOCKER [282]. Cette lignée, comme d'ailleurs les fibroblastes 3T3 de souris, est l'exemple type de cellules se situant entre les cellules normales d'une culture primaire et les cellules cancéreuses.

Comme les fibroblastes normaux, les fibroblastes BHK21 sont sensibles à l'inhibition de contact de mouvement et à l'inhibition de contact de croissance (voir p.58). Cependant, ces cellules présentent un caryotype anormal et leur inoculation à des hamsters (3.10^4 cellules) provoque l'apparition de tumeurs.

En outre, contrairement aux fibroblastes normaux en culture primaire, les fibroblastes BHK21 présentent une adhésivité réduite vis-à-vis du substrat et peuvent se multiplier dans certaines conditions sur milieux gélosés ("anchorage-independance for growth"). Le fibroblaste de référence "normal" étudié est ici le sous-clone cellulaire BHK21/C13/8 dont la croissance dépend de la présence d'asparagine dans le milieu de culture (MONTAGNIER et al. [283]), n'ayant subi qu'un nombre réduit de passages in vitro.

Le même fibroblaste, infecté par la souche B34 du virus du Sarcome du Hamster (clone BHK 21/C13/8/HS5) (ZAVADA et MAC PHERSON [284]) présente un aspect épithéloïde, est extrêmement tumorigène, après inoculation à des hamsters et est capable de se multiplier activement sur milieux gélifiés.

Les morphologies de ces deux cellules observées au microscope électronique à balayage est illustrée par la figure 25 (p.84).

D'autre part, les fibroblastes transformés (a) sont agglutinés par la Convanaline A à une concentration beaucoup plus faible (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que les fibroblastes de référence (b) (Fig.26, p.86). Enfin, la figure 3 (p.12) montre une fixation moins importante de Concanavoline A sur les glycoconjugués de la membrane de surface des fibroblastes transformés (b) et une répartition plus régulière de ces sites récepteurs chez les fibroblastes de référence (a).

Toutes ces illustrations nous ont été aimablement fournies par le Dr. G. TORPIER (Institut Pasteur, Lille).

C - Cellules uro-épithéliales humaines normales et cancéreuses.

La majorité des cancers ayant pour origine des tissus épithéliaux, nous avons cherché à appliquer nos procédés de fractionnement et de caractérisation des glycanes des glycoprotéines membranaires à des cellules issues de ces tissus.

Un modèle de choix nous a été fourni par le Professeur J. KIELER (The Fibiger Institute, Copenhague, Danemark). Il s'agit de lignées uro-épithéliales humaines établies à partir de tissus sains ou cancéreux et dont les caractéristiques biologiques sont parfaitement définies (KIELER [285], CHRISTENSEN et al. [286]). En collaboration avec l'Institut Fibiger à Copenhague et le Département d'Immunologie des Tumeurs de l'Institut Hirsfeld de WROCLAW, Pologne, nous avons examiné l'expression des glycanes membranaires de sept lignées de cellules uroépithéliales afin d'établir certaines relations entre cette expression et le caractère tumorigène in vivo et invasif in vitro des cellules. Les propriétés biologiques de ces sept lignées ainsi que les résultats de cette étude sont présentées dans la publication n°12 (p.283).

D - Cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis (Cellules LL₂) à haut et à faible pouvoir métastatique.

Afin d'étudier le rôle des glycoconjugués de la surface cellulaire dans le processus de diffusion métastatique, un modèle expérimental a été mis au point en collaboration avec le Dr. D. DUS (Département d'Immunologie des Tumeurs de l'Institut Hirsfeld de Wroclaw (Pologne)).

A partir d'une lignée établie in vitro (DUS et al. [287]) de cellules du carcinome pulmonaire de Lewis (MAYO [288]) ayant conservé leur caractère tumorigène et leur capacité de donner des métastases pulmonaires après injection in vivo à la souris C57BL/6, nous avons choisi de sélectionner différents variants cellulaires résistants à l'action toxique de certaines lectines (STANLEY [129]). Ces variants présentent généralement des altérations importantes de la biosynthèse et de l'expression des glycoconjugués membranaires et leur intérêt

intérêt dans l'étude des conséquences biologiques de ces lésions est considérable.

Un taux élevé d'acide sialique à la surface cellulaire semblant en relation directe avec le pouvoir métastatique des cellules (YOGEE SWARAN et SALK [289]), nous avons choisi de sélectionner des mutants cellulaires résistants à l'action de la lectine du germe de Blé (WGA) capable de reconnaître sélectivement les résidus d'acide sialique (BHAVANANDAN et KATLIC [290], MONSIGNY et al. [291]), les variants WGA-résistants devant présenter logiquement un plus faible pouvoir métastatique que les cellules de la lignée mère. Au contraire, la sélection par action toxique de la lectine du Ricin RCA_{II}, spécifique des résidus de galactose ou de N-acétylgalactosamine devait permettre l'obtention de variants cellulaires au pouvoir métastatique plus élevé.

Enfin, afin d'évaluer le rôle éventuel de la fucosylation des glycanes de la surface cellulaire dans le pouvoir métastatique de ces cellules, la sélection d'un variant cellulaire résistant à l'action de la lectine du champignon Aleuria aurantia (AAA), spécifique des résidus de L-fucose, que nous venions d'isoler et de caractériser (voir publication n°7, p.179) a été réalisée.

Les propriétés biologiques des différents variants cellulaires résistants à l'action des lectines sont présentées dans le mémoire suivant, soumis pour publication au périodique *Invasion and Metastasis* (publication n°1, p.96). D'autre part, la caractérisation des glycanes des glycoprotéines membranaires de ces cellules est décrite dans la publication n°13, p.290).

* *
* *

PUBLICATION N°1

LECTIN-RESISTANT VARIANTS OF MOUSE LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS.
I-SELECTION AND IN VIVO PROPERTIES.

INVASION AND METASTASIS (1987) (SUBMITTED FOR PUBLICATION)

* *
* *

INTRODUCTION

There is an evidence that the malignant phenotype is due to the cumulative effect of a stepwise alteration in cell structure and metabolism. The process of metastasis requires cells that can disseminate, survive and proliferate in a new tissue environment. The availability of cells from these different steps of the metastatic cascade should greatly facilitate an answer to the question of correlation of the events at the molecular level with a specific biological change (for review see Nicolson, 1984 ; Hart and Fidler, 1981).

The procedure to select for cell lines of different metastatic ability but similar in other traits has been performed with several animal tumor cell lines (Tao and Burger, 1977, 1982 ; Reading et al, 1980 ; Kerbel et al, 1982). The most often used method of selection with lectin is to search for the cells that are resistant to toxic lectin concentration (Stanley, 1983). Using that approach, we report here the development and characterization of a new animal model for metastasis based on LL₂ in vitro line established from Lewis lung carcinoma of C57BL/6 mouse (Dus et al, 1985). From this line, five resistant (Lec^R) variant lines have been selected with wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis agglutinin II (RCA II) and Aleuria aurantia agglutinin (AAA). Selection procedure and some tumor cell characteristics of these variants exhibiting different lung colonization abilities will be discussed along with additional data indicating different regulation on the particular routes/stages of tumor cells spread and the role of the host immune response in metastasis development. A partial report on the immunobiological properties of two of these LL₂ line WGA-resistant variants, namely LL₂5 and LL₂8 has already been presented (Radzikowski et al, 1985 ; Opolski et al, 1986). In the accompanying paper of this series we describe the characteristics of carbohydrate structure of cell surface glycopeptides of the variant cells and the correlations between the glycosylation changes and the malignant phenotype expression (Debray et al, manuscript submitted).

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions

LL₂ cell line of the Lewis lung carcinoma was established from primary tumor growing sc in C57BL/6 mice (Dus et al, 1985). The cells grew as a monolayer in EMEM containing 10 % FCS, 2 mM l-glutamine and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂/95 % air as described previously (Dus et al., 1985). The cells were seeded at a concentration of 2×10^4 cells per cm² and split at a density $1-2 \times 10^5$ per cm². These numbers were used to estimate the population doubling time. Cells were harvested by shaking them off the culture vessels to avoid any possible changes of cell surface structure after proteolytic enzyme treatment. Cell number was assessed by counting in hemocytometer and viability by trypan blue dye exclusion. Staining with Hoescht 33258 fluorochrome showed the cells to be free of Mycoplasma contamination (Chen, 1977).

Cloning efficiency

Monodispersed cells were placed in 0.3 % semisolid agar EMEM medium containing 15 % FCS. Half ml aliquots containing 200 or 500 cells per well were plated onto 24-well tissue culture plate and incubated 8-10 days. After incubation, the colonies of more than 50 cells were counted.

Selection of lectin resistant variants

Variants were isolated from LL₂ line by selection of cells capable of growing in the presence of a normally toxic concentration of lectins. The lectins used were : WGA, RCA II and AAA, with simple sugar specificity for N-acetylglucosamine, galactose and L-fucose, respectively. All lectins were from our own preparations (Debray et al., 1981 ; Debray and Montreuil, 1987). Lectins stock solutions made in PBS were filtered through 0.22 μ filters and stored at 4° C.

In order to determine the minimal lectin concentration necessary for elimination of the majority of the parental cells, cultures were started in 24-well tissue culture plates at concentration of 1×10^3 cells in 0.5 ml of growth medium per well. The twofold dilutions of lectins were added and the cells were incubated for 7 days. At the end of incubation, cell growth in the wells was evaluated and the first lectin concentration which inhibited the cell growth was chosen for the first selection.

LL₂ cells (1×10^6 cells) were plated onto 25 cm² Falcon flasks. After several hr, the lectin was added and the cultures were incubated in the presence of lectin. The selective medium was changed every 3 day. After 10-14 days the cultures were examined and those with a few surviving cells selected. The lectin-containing medium was then replaced with normal growth medium and the remaining cells were allowed to regrowth. The procedure was repeated until there was no visible effect of the given lectin concentration on the cell growth. The next selection was done using a higher dose of the lectin. The selection procedure was carried on until the limit concentration of the lectin was reached. The selecting lectins concentrations were : 10-100 µg/ml for WGA, 0.01-1.0 µg/ml for RCA II and 1.0-10 µg/ml for AAA.

The variants obtained during the selections were : LL₂5 (resistant to 20 µg/ml of WGA, selected through five cycles of lectin treatment), LL₂8 (resistant to 100 µg/ml of WGA, selected through eight cycles of lectin treatment), LL₂30 (resistant to 100 µg/ml of WGA, selected through thirty cycles), LL₂RCA II (resistant to 1 µg/ml of RCA II, selected through twelve cycles) and LL₂AAA (resistant to 10 µg/ml of AAA, selected through ten cycles).

The cells were considered resistant if more than 50 % of them survived and were able to grow in the presence of given lectin concentration in the same conditions as described above for estimating the lectin toxicity. After isolation of variant sublines, the repository stock was frozen in liquid nitrogen. All further experiments were done on cells passaged in vitro no longer than two months. The lectin resistance of obtained variants remained

relatively stable during the time of experiments.



Mice

B6D2F1 mice 4-8 weeks old were obtained from Inbred Mice Center of the Institute of Immunology and Experimental therapy, Wrocław. For each experiment, mice were age- and sex-matched.

Assessing of tumorigenicity

Local tumor growth was estimated by inoculation of 2×10^6 cells sc into the lower right flank. After 21 days the tumor size was evaluated and the average tumor weight calculated as described previously (Dus et al., 1985).

Spontaneous metastasis assay

Mice were inoculated sc with 2×10^6 cells. After 21 days animals were killed, their lungs were removed and surface pulmonary metastases were visualized by distending the bronchi with India ink (for details see Wexler, 1966). The metastatic potential is defined as the percentage of animals that developed lung metastases. The metastatic rate is calculated as a mean number of tumor foci per lung.

Experimental metastasis assay

Mice were given iv injections of 0.2 ml suspension containing 3×10^5 cells, via the tail vein. Only single cell suspensions of more than 95 % viability were used. Mice were killed 21 days after inoculation and lung metastases were evaluated as described above.

RESULTS

The variant sublines described here were selected through several cycles of one lectin treatment. Although single-step treatment may also lead to fully resistant cell lines and clones (Stanley, 1983), we did not succeed in selecting variants resistant to chosen, comparatively high doses of lectins after single treatment. All the Lec^R variants were selected without prior mutagenesis. The final lectin resistance of WGA-resistant variants : LL₂5, LL₂8 and LL₂30 was 20, 100 and 100 µg/ml, respectively. One hundred µg seems to be the highest possible dose for survival of LL₂ cells. It was not possible to obtain cells resistant to higher concentration of this lectin even after 30 selections, as in the case of LL₂30 variant. The LL₂ cells final resistance to RCA II was as high as 1 µg/ml, and to Aleuria aurantia agglutinin 10 µg/ml.

The Lec^R variants have remained similar in morphology and in vitro growth rate to the parental cells. Their population doubling time ranged from a mean 20.9 hr for LL₂AAA to 22.4 hr for LL₂5 cells whereas the parental LL₂ line exhibited a population doubling time of 21.2 hr in the exponential phase. The variants differed in the ability to form colonies in semisolid medium. The LL₂ parental line possessed a mean 19 percent of colony forming cells in 0.3 % agar in the presence of 15 % FCS. For LL₂5, LL₂8 and LL₂RCA II variants, the percentage of clonogenic cells was lower (8.5, 8 and 12.5 %, respectively). The LL₂30 and LL₂AAA variants expressed higher clonogenicity (29 and 39 % of clonogenic cells, respectively).

The tumorigenicity and spontaneous metastatic behavior of the parent LL₂ line and the five Lec^R variants after sc inoculation are summarized in Table I. For WGA and AAA-selected variants, the average tumor weight estimated on day 21 after inoculation of 2×10^6 cells were similar as that of the parental line. The mean values of sc tumor weight for groups of at least 10 mice were : LL₂5-948 mg, LL₂8-878 mg, LL₂30-1645 mg and LL₂AAA-1235 mg. The LL₂RCA II variant mean tumor weight was estimated to be 2.5 times higher than that of the parental line (3170 vs 1263 mg). As can be seen, the repeated selection of LL₂ cells five, eight or more times with WGA did not significantly altered the tumorigenicity of these cells, but their

ability to produce spontaneous lung metastases was greatly diminished.

The parental line gave rise to local tumors in 100 % of inoculated animals and spontaneously metastasized in 84 % of tumor-bearing animals, with a mean number of pulmonary foci per mouse equal to 6.2. The Lec^R variants also formed tumors in all recipients but metastasized spontaneously in lower percentage of the tumor bearing animals. The mean number of tumor nodules per lung ranged from 0.1. for LL₂8 and LL₂RCA II variants to 0.7 for LL₂30 variant indicating at least a tenfold reduction of metastatic ability after lectin selection.

The original parental LL₂ line and all variants selectively metastasized to the lungs. Liver and spleen metastases were not observed. The metastatic potential of Lec^R variants was found quite stable during 2 successive months passaging in vitro.

Though estimation of the growth rate of the parent line and the Lec^R variants did not revealed any consistant correlation between their growth potential and lectin resistance, it is evident that the lectin selection process lead to significant reduction of their spontaneous metastatic ability.

The ability of LL₂ line and its Lec^R variants to colonize the lungs after iv inoculation (experimental metastases) of 3×10^5 cells are presented in Table II. These results suggest that resistance to WGA is also accompanied by changes in experimental metastatic ability. WGA-resistant variants exhibited markedly reduced experimental metastases which was expressed in the incidence as well as in the rate of lung tumor appearance. Also highly tumorigenic LL₂RCA II variant had reduced experimental metastasibility. On the contrary, the LL₂AAA variant, whose tumorigenicity remained unchanged, possessed increased lung colonization potential. After inoculation of LL₂AAA cells, the mean number of tumor colonies per lung was four times higher than that of the parental line (56 vs 13.8) in 100 % of inoculated recipients.

The differences in the metastasibility among the variants raised questions concerning lectin resistance and the role of host

immune system in the metastasis development. To study this, mice were treated with cyclophosphamide (CY). Such pretreated mice given iv injections with various WGA-resistant variants were compared with normal control mice for their capacity to restrict the expression of metastatic phenotype. Mice treated with CY appeared to be 5-8 times more sensitive to the metastases onset independently of the inoculated Lec^R variant. Increase in the number of lung tumor nodules per mice and also in the percentage of mice developing metastases was observed, but the relative proportion of lung metastases obtained after injection of Lec^R variant cells to those obtained after injection of the parental LL₂ cells remained unchanged (Table III).

DISCUSSION

The loss of metastatic capacity may be the result of some changes which affect specific cell surface structures that would allow cells to leave tumoral tissue and to reach the secondary site of implantation. All Lec^R variants examined exhibited reduced spontaneous metastatic ability. An interesting finding in the present study was that the selection with AAA resulted of cells with reduced spontaneous metastasibility but with high lung colonization potential. The fact that we have been able to select tumorigenic, non-metastasizing spontaneously but highly metastatic after intravenous inoculation variant supports the hypothesis that organ colonization potential after administration of cells directly into blood vessels does not necessarily predict spontaneous metastatic potential (Layton and Franks, 1986 ; Stackpole, 1981). We also investigated the relationship between spontaneous and experimental metastases because the widespread use of iv-injected cells as a metastasis model requires the definition of their relevance to spontaneous events. Unlike Sweeney et al. (1982) we did not observe any relationship between the degree of spontaneous metastases and the degree of experimental metastases.

In order to find out if the tumorigenic potential of LL₂ cells correlates with their metastatic ability, statistical analysis was performed on these two parameters. A correlation coefficient of $t=0.3325$ was obtained, indicating that there was no significant correlation between spontaneous metastatic ability of a variant and its in situ growth parameters ; there was also no correlation between tumorigenicity and experimental metastatic ability. Our results together with those of Olsson and Forchhammer (1984) and Layton and Franks (1986) show that the metastatic but not the tumorigenic potential of the Lewis lung carcinoma cells can be suppressed by selection of lectin resistant cells indicating that the genetic determinants involved in the expression of the tumorigenic and metastatic phenotype are, at least in part, expressed independently. It confirms the necessity for an assay for metastasis which would cover all steps in metastasis (Burger, 1980).

There was no significant correlation between the metastasibility and the in vitro morphology and/or growth rate of Lec^R variant cells. However, it occurred that there is a strong correlation between the ability of cells to grow as colonies in soft agar culture and their organ colonizing capacity (experimental metastases). The percentage of clonogenic cells in LL₂ and LL₂ AAA lines, which do metastasize after iv inoculation, was higher than that of the variants with reduced metastasibility. It has been demonstrated previously that there is strong correlation between the ability of cells to grow as colonies in suspension culture and tumorigenicity (Mac Pherson and Montagnier, 1964). Correlations also have been claimed between colonial morphology in suspension and experimental metastasis (Clark and Sidebottom, 1984).

The differences in experimental metastases observed among Lec^R variants cannot be explained at present. It seems possible that they may reflect a rearrangement of some specific structure(s) of cell surface oligosaccharides after lectin treatment. The biochemical features of the variants are presently being investigated as well as the possible role played by host factors in the different metastatic phenotype expression.

Metastasis appears to result from a selective growth of tumor cells which are capable of escaping from host control mechanisms (Hart and Fidler, 1981). It is of interest that the loss of metastatic ability was not a result of some consistent changes in immunogenicity of the Lec^R LL₂ variants. The differences among them concerning metastability remained the same in CY-modified mice as they were in normal recipients. In CY-treated recipients, the average number of lung metastases was 3-5 fold higher than in normal, non-treated animals. It can be concluded that both tumor cells and host properties determine the level of expression of metastatic phenotype.

Variation in the cell surface pattern can change the specific ability of tumor cells to interact with each other and with the host cells during development of metastasis. Our preliminary observations indicate that WGA resistance of LL₂ cells which was accompanied with a loss of metastatic ability was not correlated with the postulated loss of alloantigens. On the contrary, it was found

that the expression of H-2 encoded antigens in the case of non-metastasizing LL₂⁵ variant was higher than that of the parental line, including increased level of normal H-2^b antigens as well as the presence of alien H-2^k and H-2^d specificities (Opolski et al, 1986).

The variants selected were not cloned and are, at best, representative of a majority population with certain characteristics. But, otherwise, the evidence presented by Poste et al (1981), showed that while individual clones that form a tumor may be unstable, the overall population comprised of these clones is very stable.

Sumarizing, it is possible to select, with the use of lectins, tumor cell variants that differ in both spontaneous and experimental metastatic behavior and whose phenotypic features are relatively stable under nonselective culture conditions. The Lec^R LL₂ variants range of lung colonizing ability make them an useful model for metastasis studies and for the screening of therapeutic agents.

REFERENCES

BURGER, M.M. : The cell surface and metastasis. Biology of the cancer cell. Proceedings of the Fifth Meeting of the European Association for Cancer Research, Vienna 9-12 September 1979, pp. 193-208, KUGLER Publications, Amsterdam (1980).

CHEN, T. R. : In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoescht 33258 stain. Exp. Cell Res., 104, 255-262 (1977).

CLARK, S.R. and SIDEBOTTOM, E. : Selection of metastatic variants on the basis of clonal morphology in vitro. Invasion Metastasis, 4, suppl. 1, 1-11 (1984).

DEBRAY, H., DUS, D., HUESO, P., RADZIKOWSKI, C., and MONTREUIL, J. : Lectin resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. II. Altered glycosylation of membrane glycoproteins. Invasion Metastasis, (submitted for publication).

DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J. : Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. Eur. J. Biochem., 117, 41-55 (1981).

DEBRAY, H. and MONTREUIL J. : A new isolation procedure of the lectin from the mushroom Aleuria aurantia and further study of its specificity toward various glycopeptides and oligosaccharides. Glycoconjugate J. (1987) (submitted for publication).

DUS, D., BUDZYNSKI, W. and RADZIKOWSKI, C. : LL₂ cell line derived from transplantable murine Lewis lung carcinoma. Maintenance in vitro and growth characteristics. Arch. Immunol. Ther. Exper., 33, 817-823 (1985).

HART, I.R. and FIDLER, I.J. : The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. Biochim. Biophys. Acta, 651, 37-50 (1981).

KERBEL, R.S., DENNIS, J.W., LAGARDE, A.E. and FROST, P. : Tumor progression in metastasis : an experimental approach using lectin resistant tumor variants. *Cancer Metast. Rev.*, 1, 99-140 (1982).

LAYTON, M.G., and FRANKS, L.M. : Selective suppression of metastasis but not tumorigenicity of a mouse lung carcinoma by cell hybridization. *Int. J. Cancer*, 37, 723-730 (1986).

MAC PHERSON, J. and MONTAGNIER, L. : Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 23, 291-294 (1964).

NICOLSON, G.L. : Cell surface molecules and tumor metastasis. Regulation of metastatic phenotypic diversity. *Exp. Cell Res.*, 150, 3-22 (1984).

OLSSON, L. and FORCHHAMMER, J. : Induction of the metastatic phenotype in a mouse tumor model by 5-azacytidine and characterization of an antigen associated with metastatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3389-3393 (1984).

OPOLSKI, A., DUS, D. and RADZIKOWSKI, C. : Serological analysis of H-2 antigens expression on the cell surface of drug- and lectin-resistant mouse tumor cells. *Arch. Immunol. Ther. Exper.*, 34, 21-34 (1986).

POSTE, G. DOLL, J. and FIDLER, I.J. : Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6226-6230 (1981).

RADZIKOWSKI, C., DUS, D., OPOLSKI, A. and STRZADALA, L. : Characteristics of LL₂ and its lectin-resistant non metastasizing variants. *Proceedings of the Symposium on Biochemistry and Molecular Genetics of Cancer Metastasis*, Bethesda, Maryland March 18-20, pp. 237-249 (1985).

READING, C.L., BELLONI, P.N. and NICOLSON, G.L. : Selection and in vivo properties of lectin-resistant variants of malignant murine lymphosarcoma cell line. *J. Nat. Cancer Inst.*, 64, 1241-1249 (1980).

STACKPOLE, C.W. : Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. Nature (London), 289, 798-800 (1981).

STANLEY, P. : Selection of lectin-resistant mutants of animal cells. Methods Enzymol., 96, 157-184 (1983).

SWEENEY, F.L., POT-DEPRUN, J., POUPON, M.F. and CHOUROULINKOV, I. : Heterogeneity of the growth and metastatic behavior of cloned cell lines derived from a primary rhabdomyosarcoma. Cancer Res., 42, 3776-3782 (1982).

TAO, T.W. and BURGER, M.M. : Non-metastasizing variants selected from metastasizing melanoma cells. Nature (London), 270, 437-438 (1977).

TAO, T.W. and BURGER, M.M. : Lectin-resistant variants of mouse melanoma cells. I. Altered metastasizing capacity and tumorigenicity. Int. J. Cancer, 29, 425-430 (1982).

WEXLER, H. : Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Natl. Cancer Inst., 36, 641-645 (1966).

TABLE I

TUMORIGENICITY AND SPONTANEOUS METASTATIC CAPACITY OF LL₂ CELLS
AND LECTIN SELECTED VARIANTS^a

Cells	Tumor weight, g	Probability ^b	No. of Pulmonary metastases (range)	Mice with metastases/ total inoculated (%)
LL ₂ (parental)	1263 ± 558 ^c		6,2 ± 4,6 (0-12)	22/26 (84)
LL ₂ ⁵	948 ± 401	> 0,05	0,2 ± 0,4 (0-1)	2/13 (15)
LL ₂ ⁸	878 ± 431	< 0,05	0,1 ± 0,3 (0-1)	1/13 (7)
LL ₂ ³⁰	1645 ± 1455	> 0,05	0,7 ± 0,9 (0-2)	5/10 (50)
LL ₂ ^{AAA}	1235 ± 794	> 0,05	0,5 ± 1,0 (0-5)	7/28 (25)
LL ₂ ^{RCAII}	3170 ± 1969	< 0,05	0,1 ± 0,2 (0-1)	1/17 (6)

^aB6D2F1 mice autopsied 21 days after sc inoculation of 2 x 10⁶ tumor cells.

^bprobability of no difference from parent line, as compared by two-tailed Student's t-test.

^cMean ± SD

TABLE II
 EXPERIMENTAL METASTASIS OF LL₂ CELLS AND LECTIN SELECTED VARIANTS^a

Cells	No. of Pulmonary metastases (range)	No. of mice with metastases/ total inoculated (%)
LL ₂ (parental)	13,8 ± 11 ^b (0-14)	37/38 (97)
LL ₂ 5	1,2 ± 1,4 (0-5)	28/39 (73)
LL ₂ 8	0,8 ± 1,1 (0-4)	18/41 (43)
LL ₂ 30	0,6 ± 0,7 (0-2)	4/11 (36)
LL ₂ AAA	57,5 ± 22,7 (18-90)	18/18 (100)
LL ₂ RCAII	2,9 ± 3,5 (0-11)	14/21 (67)

^aB6D2F1 mice autopsied 21 days after iv inoculation of 3 x 10⁵ tumor cells/mouse.

^bMean ± SD.

TABLE III

EXPERIMENTAL METASTASIS CAPACITY OF LL₂ CELLS AND WGA
RESISTANT VARIANTS IN NORMAL AND CY-PRETREATED RECIPIENTS^a

Cells	Pretreatment with CY	No. of Pulmonary metastases (range)	No. of mice with metastases/ total inoculated (%)
LL ₂ (parental)	-	17,5 ± 11,0 ^b (1-40)	27/27 (100)
	+	56,0 ± 19,2 (16-85)	17/17 (100)
LL ₂ ⁵	-	1,4 ± 1,5 (0-5)	17/29 (59)
	+	12,0 ± 12,0 (0-33)	20/25 (80)
LL ₂ ⁸	-	0,9 ± 1,2 (0-4)	15/30 (50)
	+	6,7 ± 5,0 (0-22)	25/26 (96)
LL ₂ ³⁰	-	1,1 ± 1,8 (0-6)	5/14 (35)
	+	5,8 ± 5,2 (0-16)	9/10 (90)

^aB6D2F1 mice were injected i.p. with CY (200 mg/kg) 20 hr before iv inoculation of 3×10^5 tumor cells. Mice were autopsied 21 days after tumor inoculation.

^bMean ± SD.

CONCLUSIONS

Afin d'étudier le rôle des glycoconjugués de la surface cellulaire dans le processus de diffusion métastatique, nous disposons donc de 3 variants cellulaires résistants à l'action toxique de la lectine de germe de blé (WGA). Ces lignées cellulaires LL₂-5, LL₂-8 et LL₂-30 possèdent des pouvoirs métastatiques naturel (déterminé par injection sous-cutanée des cellules à la souris) ou expérimental (déterminé par injection intraveineuse) plus faibles que celui des cellules de la lignée mère.

Un autre variant cellulaire résistant à l'action toxique de la lectine de ricin (RCA_{II}) présente également des pouvoirs métastatiques naturel et expérimental réduits, mais possède un pouvoir tumorigène très supérieur à celui des cellules de la lignée mère.

Enfin, un cinquième variant cellulaire, résistant à l'action toxique de la lectine d'Aleuria aurantia a également été sélectionné. Ces cellules présentent un pouvoir métastatique expérimental 10 fois supérieur à celui des cellules de la lignée mère.

Nous disposons donc d'un excellent modèle cellulaire permettant l'étude des corrélations pouvant exister entre l'expression de certains glycanes à la surface cellulaire et le pouvoir tumorigène et métastatique de ces cellules. La caractérisation des glycanes des glycoprotéines membranaires de ces cellules est décrite dans la publication n°13, p.290.

II - Utilisation des lectines dans l'étude des glycanes des glycoprotéines membranaires.

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine bactérienne, végétale ou animale, dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire, capables de se lier spécifiquement à des sucres simples ou à des oligosaccharides plus complexes, sans les modifier (GOLDSTEIN et al. [292]) et capables, pour la plupart, de provoquer l'agglutination de divers types cellulaires.

A l'époque où nous débutons nos travaux, les lectines et en particulier les lectines végétales étaient classées en fonction du sucre simple (inhibiteur hapténique) capable d'inhiber la réaction d'agglutination induite par la lectine. Un exemple de classification de ce type est présenté p.115.

Désirant utiliser la chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines immobilisées pour fractionner les glycopeptides d'origine membranaire, il nous fallait, dans un premier temps, mieux définir la spécificité des lectines les plus couramment utilisées.

Nos travaux ont porté d'une part, sur les lectines en solution, en recherchant les structures oligosaccharidiques les plus susceptibles d'inhiber l'hémagglutination induite par ces lectines.

D'autre part, nous avons également précisé les performances des mêmes lectines, après immobilisation sur Sepharose 4B.

Ces études ont pu être réalisées, grâce à la mise à notre disposition de plusieurs dizaines d'oligosaccharides ou de glycopeptides d'origines diverses, isolés par les Drs. G. STRECKER et A. PIERCE-CRETEL ainsi que par le Professeur G. SPIK.

A - Spécificité des lectines en solution.

Pour préciser ces spécificités, nous avons mesuré le pouvoir inhibiteur de divers oligosaccharides et glycopeptides, provenant de N-glycosylprotéines, sur l'agglutination de globules rouges humains O⁺ induite par les lectines. Les expériences d'agglutination et d'inhibi-

tion d'agglutination ont été réalisées à l'aide de plaques de microtitration, par la technique de double dilution et les résultats sont exprimés en mM de sucres capables d'inhiber totalement l'hémagglutination induite par la lectine.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le mémoire n°2, p.115.

* * *

Publication N°2

SPECIFICITY OF TWELVE LECTINS TOWARDS OLIGOSACCHARIDES
AND GLYCOPEPTIDES RELATED TO N-GLYCOSYLPROTEINS

EUR. J. BIOCHEM. (1981), 117, 41-55.

* * *

Specificity of Twelve Lectins Towards Oligosaccharides and Glycopeptides Related to *N*-Glycosylproteins

Henri DEBRAY, Dominique DECOUT, Gérard STRECKER, Geneviève SPIK, and Jean MONTREUIL

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique n° 217, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq and Institut de Recherche sur le Cancer (Institut Jules Driessens) et Unité n° 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille

(Received July 2/November 28, 1980)

Glycopeptides and oligosaccharides of either the *N*-acetylglucosaminic or the oligomannosidic type derived from glycoproteins containing the *N*-glycosylamine linkage were used to define the specificity of different lectins (concanavalin A, *Lens culinaris* agglutinin, *Vicia faba* agglutinin, *Pisum sativum* agglutinin, *Ricinus communis* agglutinins, soybean agglutinin, wheat germ agglutinin, *Solanum tuberosum* agglutinin, *Datura stramonium* agglutinin, *Lotus tetragonolobus* agglutinin, *Ulex europeus* agglutinin) by studying the inhibition of human red blood cell agglutination by these structures. The results obtained show that lectins considered 'identical' in terms of monosaccharide specificity, possess the ability to recognize fine differences in more complex structures. In fact, different lectins are able to recognize different saccharidic sequences on the same glycan structure. As these sequences are likely to be common to numerous glycoproteins, including cell membrane glycoproteins, the results obtained with lectins in the study of cell surface carbohydrates have to be very carefully interpreted.

Moreover, our results confirm previous data on the spatial configuration of the glycan moiety of glycoproteins deduced from the construction of molecular models: the fact that oligosaccharides bearing an α -NeuAc-(2→6)-Gal unit are more powerful inhibitors than oligosaccharides bearing an α -NeuAc-(2→3)-Gal unit could be related to the high rotational freedom of α -2,6 linkage; the observation that glycoasparagines, glycopeptides and glycoproteins possess a higher affinity for lectins than the related oligosaccharides could be explained by the fact that the glycan–amino acid linkage leads to structures more rigid than those of the oligosaccharides themselves.

Lectins are now widely used as tools in the study of plasma membrane modifications in neoplasia. Numerous lectins have been purified and their properties well defined (for reviews see [1,2]). Lectins are able to bind sugars specifically, but it is well known that the monosaccharide residue in a terminal non-reducing position on a glycan is not the only carbohydrate moiety recognized. Indeed, Kornfeld et al. [3] have shown that the binding constant of the specific free sugar with a lectin may be several orders of magnitude lower than the binding constant of a glycoconjugate containing this sugar. Moreover, in the particular case of concanavalin A, the authors demonstrated that the most active part of a glycan structure of the *N*-acetylglucosaminic type are not the α -mannose residues in a terminal position but the disaccharide *N*-acetyl- β -D-glucosaminyl-(1→2)- α -D-mannoside.

In the present study, we have used numerous oligosaccharides and glycopeptides derived from *N*-glycosylproteins to define the specificities to twelve lectins (Table 1), by determining their ability to inhibit the agglutination of human red blood cells induced by these lectins. These results have been preliminarily reported in [4,5].

Abbreviations. NaCl/Pi, 0.01 M sodium phosphate, 0.14 M sodium chloride pH 7.2; Gal, D-galactose; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; Man, D-mannose; Fuc, L-fucose; Asn, L-asparagine.

Enzymes. β -D-Galactosidase (EC 3.2.1.23); *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30); α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51); neuraminidase (EC 3.2.1.18).

Note. All sugars are of the D configuration unless otherwise stated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All the lectins used in this study (Table 1), except concanavalin A which was purchased from Pharmindustrie (Clichy, France), were purified by us by affinity chromatog-

Table 1. List of lectins used in this study and classified according to Goldstein and Hayes [2]

Specificity	Lectin
α -Mannose or α -glucose	Concanavalin A from <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean lectin) <i>Lens culinaris</i> agglutinin <i>Vicia faba</i> agglutinin <i>Pisum sativum</i> agglutinin
β -Galactose and <i>N</i> -acetyl- β - galactosamine	<i>Ricinus communis</i> agglutinin I <i>Ricinus communis</i> agglutinin II Soybean agglutinin (<i>Glycin max</i> agglutinin)
<i>N</i> -Acetyl- β - glucosamine	Wheat germ agglutinin (<i>Triticum vulgare</i> agglutinin) <i>Solanum tuberosum</i> agglutinin (potato agglutinin) <i>Datura stramonium</i> agglutinin
α -L-Fucose	<i>Lotus tetragonolobus</i> agglutinin <i>Ulex europeus</i> agglutinin

Origin	Name	Abbreviation	Structure
Human milk	Neuraminyl (α2→3) lactose	NL α-2,3	α-NeuAc-(2→3)-β-Gal-(1→4)-Glc
Human milk	Neuraminyl (α2→6) lactose	NL α-2,6	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-Glc
Mannosidosis	Mannoside 1	M-1	α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Mannoside 2	M-2	α-Man-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Mannoside 3	M-3	α-Man-(1→2)-α-Man-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc
Sialidosis	Sialoside 1	N-1	α-NeuAc-(2→3)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Sialoside 2	N-2	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Sialoside 3	N-3	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Sialoside 4	N-4	α-NeuAc-(2→3)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→6) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Sialoside 5	N-5	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→6) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Sialoside 6	N-6	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→6) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
Sialoside 9	N-9	α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc α-NeuAc-(2→6)-β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→6) } β-Man-(1→4)-GlcNAc	
GM ₂ - Gangliosidosis variant O (Sandhoff's disease)	Oligosaccharide S-6a	S-6a	β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
	Oligosaccharide S-5b	S-5b	β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3) } β-GlcNAc-(1→4)-β-Man-(1→4)-GlcNAc β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→6) } β-Man-(1→4)-GlcNAc
Fucosidosis	Fucoside 1	F-1	α-Fuc-(1→6)-GlcNAc
	Fucoside 2	F-2	β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-(1→2)-α-Man-(1→3)-β-Man-(1→4)-GlcNAc 1,3 α-Fuc
	Glycopeptide I	GP-F-1	α-Fuc-(1→6)-β-GlcNAc-(1→)-Asn
	Glycopeptide II	GP-F-2	α-Man-(1→6)-β-Man-(1→4)-β-GlcNAc-(1→4)-β-GlcNAc-(1→)-Asn 1,6 α-Fuc
Glycopeptide III	GP-F-3	[β-Gal-(1→4)-β-GlcNAc-] (1→2) [α-Man-(1→3) } 1,3 (1→4) β-Man-(1→4)-β-GlcNAc-(1→4)-β-GlcNAc-(1→)-Asn α-Fuc (1→6) [α-Man-(1→6) } 1,6 α-Fuc	

Fig. 1. Structure of the oligosaccharides and glycopeptides isolated from the urines of patients with various lysosomal diseases [20] and used in the present study

raphy and were judged to be homogeneous by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis performed as described by Laemmli [6].

Lens culinaris Agglutinin. *Lens* agglutinin used in this study, was isolated by affinity chromatography as described by Toyoshima et al. [7]. This lentil lectin is a mixture of two proteins named LCH-A and LCH-B by Howard et al. [8], which can be further separated by ion-exchange chromatography on a carboxymethyl-cellulose column. Although these two isolectins can differ in their carbohydrate-binding specificity, the results presented in this study were obtained with the natural mixture as prepared by affinity chromatography.

Vicia faba Agglutinin. *Vicia* agglutinin was purified from *Vicia faba* seeds (broad bean) purchased from Vilmorin (France), by affinity chromatography on Sephadex G-150 as described [9].

Pisum sativum Agglutinin. *Pisum* agglutinin was purified from common garden-pea seeds by affinity chromatography on Sephadex G-75 as described by Entlicher et al. [10]. In fact, as for *Lens* agglutinin, this lectin is a mixture of two isolectins I and II, which are separable by DEAE-cellulose ion-exchange chromatography [10]. Although these two isolectins can differ in their carbohydrate specificity, the results presented in Table 2 were obtained with the natural mixture as prepared by affinity chromatography.

Ricinus communis Agglutinins I and II. Two distinct lectins are present in *Ricinus communis* seeds: RCA_I and RCA_{II}, according to the nomenclature of Nicolson et al. [11]. Lectin I is a hemagglutinin with a molecular weight of 120000; Lectin II is a toxin with a molecular weight of 60000.

In this study, *Ricinus* agglutinins I and II were prepared by combining affinity chromatography and gel filtration: first,

Origin	Abbreviation	Structure
A. Human serotransferrin	GP-hSTF	$\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{)-Asn}$
B. Human lactotransferrin	GP-hLTF-1	$\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$ $\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{-Asn}$ $\alpha\text{-Fuc}$
C. Human lactotransferrin	GP-hLTF-2	$\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$ $\alpha\text{-Fuc}$
D. Hen ovotransferrin	GP-ovoTF	$\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{-Asn}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$
E. human Cohn's fraction IV	GP-F-IV	$\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)}$ $\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{-Asn}$
F. Bovine lactotransferrin	GP-bLTF	$\alpha\text{-NeuAc-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$ $\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{-Asn}$ $\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$ $\alpha\text{-Man}$
G. Hen ovomucoid	GP- β ovo	$\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{?)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{3)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{-Asn}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{6)}$ $\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{4)}$

Fig. 2. Structure of the glycopeptides isolated from human and bovine lactotransferrin, human serotransferrin, hen ovotransferrin, Cohn's fraction IV and hen ovomucoid, used in the present study

Ricinus seed extract was subjected to affinity chromatography on a Sepharose - *N*- ϵ -aminocaproyl- β -galactopyranosylamine column prepared according to Gordon et al. [12]. Both *Ricinus* agglutinins I and II were eluted with 0.1 M galactose and then separated on a Sephadex G-150 column equilibrated with NaCl/P_i.

Soybean Agglutinin. Soybean agglutinin was purified by affinity chromatography on a column of Sepharose - *N*- ϵ -aminocaproyl- β -galactosylamine according to Gordon et al. [12].

Wheat-Germ Agglutinin. Wheat-germ agglutinin was purified by affinity chromatography on a column of Sepharose - 2-acetamido-*N*- ϵ -aminocaproyl-2-deoxy- β -glucopyranosylamine according to Lotan et al. [13].

Solanum tuberosum Agglutinin. *Solanum* agglutinin was purified according to the procedure of Delmotte et al. [14].

Datura stramonium Agglutinin. *Datura* agglutinin was purified from seeds of *Datura stramonium* by affinity chromatography on a Sepharose-ovomucoid column (unpublished results).

Lotus tetragonolobus Agglutinin. *Lotus* agglutinin was purified by affinity chromatography on a column of Sepharose - *N*- ϵ -aminocaproyl- β -L-fucopyranosylamine according to Blumberg et al. [15]. This lectin is in fact a mixture of three different proteins which can be further separated by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose [16] and which have been shown to possess the same specificity [17]. The

results presented were obtained with the natural mixture prepared by the affinity chromatography procedure described above.

Ulex europaeus Agglutinin. *Ulex europaeus* seeds contain two agglutinins with different sugar specificities as shown by Flory [18] and Matsumoto and Osawa [19]: the first has an affinity for α -L-fucose (lectin I) while the other seems to be specific for chitobiose (lectin II).

Ulex agglutinin I used in this study was purified by affinity chromatography on a column of Sepharose - *N*- ϵ -aminocaproyl- β -L-fucopyranosylamine prepared as described [15].

Oligosaccharides and glycopeptides shown in Fig. 1, were isolated by G. Strecker [20] from the urines of patients with various lysosomal diseases. Human transferrin and human lactotransferrin as well as glycopeptides prepared from them, glycopeptide isolated from ovotransferrin and glycopeptide isolated from Cohn's fraction IV (see structures in Fig. 2), were isolated by G. Spik.

The glycopeptide of the oligomannosidic type, isolated from bovine lactotransferrin (see structure in Fig. 2) was a gift from Dr A. Chéron.

All these structures derive from glycoproteins with the *N*-glycosidic linkage and belong to two types of glycan structures: the *N*-acetylglucosaminic type and the oligomannosidic type, according to Montreuil [21].

Some of these oligosaccharides or glycopeptides were enzymatically digested with neuraminidase from *Clostridium perfringens*, β -galactosidase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase

from Jack-bean meal and α -L-fucosidase from rat kidney (Boehringer) as previously described [22].

Hemagglutination Tests

Agglutination of human red blood cells, group O⁻, in NaCl/P_i and inhibition of this hemagglutination by various oligosaccharides or glycopeptides was carried out in Linbro microtiter U-plates Titertek (Linbro Scientific Co, Hamden, USA) by a twofold serial dilution technique [19].

To each 0.05 ml of twofold serial dilution of sugar solution, in NaCl/P_i, was added an equal volume of lectin solution, carefully diluted to contain four minimum hemagglutinating doses.

After incubation for 1 h at room temperature, 0.05 ml of a 3% erythrocyte suspension in NaCl/P_i was added. The mixture was kept for 1 h at room temperature and then examined for agglutination.

Results were expressed as the minimum concentration (mM) required to completely inhibit one hemagglutinating dose; account was taken of the threefold dilution caused by the addition of lectin and erythrocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

LECTINS WITH A SPECIFICITY FOR α -MANNOSE OR α -GLUCOSE

Concanavalin A

The results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by concanavalin A are presented in Table 2 and can be summarized as follows.

As shown on Fig. 3, concanavalin A presents a great affinity for the trimannosidic core substituted by two *N*-acetyl- β -glucosaminyl residues (oligosaccharide S-6a). The affinity is not decreased when this structure is modified by the addition of a β -(1 \rightarrow 4)-linked *N*-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue (oligosaccharide S-5b). On the contrary, the affinity is reduced when these *N*-acetylglucosamine residues are substituted by galactosyl residues (sialosides 5 and 6, and the asialoglycopeptide from human serotransferrin) or by sialogalactosyl residues (sialoside 9, glycopeptide from human serotransferrin). Moreover, the presence of an α -(1 \rightarrow 6)-linked mannose residue in a terminal non-reducing position enhances the affinity as demonstrated by the fact that sialoside 3 (Fig. 1) is 66-fold more inhibitory than sialoside 2.

On the other hand, mannoside 1 (Fig. 1) which possesses an exposed α -(1 \rightarrow 3)-mannose, but which lacks the core structure, is a poor inhibitor, even when this α -(1 \rightarrow 3)-linked mannose is substituted by one or two α -(1 \rightarrow 2)-linked mannose residues (mannosides 2 and 3). However, the glycopeptide isolated from bovine lactotransferrin which possesses the complete trimannosidic structure with the α -(1 \rightarrow 3)-linked and α -(1 \rightarrow 6)-linked mannose residues substituted by four additional α -linked mannose residues (oligomannosidic type structure) is a very good inhibitor of hemagglutination.

Substitution of the core α -(1 \rightarrow 3)-linked mannose residue at position C-4, as in the glycopeptide from ovotransferrin, decreases the affinity of concanavalin A as compared to the asialogalacto form of glycopeptide from serotransferrin (Fig. 3).

No difference can be found between the inhibitory power of a glycopeptide isolated from transferrin (Fig. 2A) and the oligosaccharidic structure derived from it (sialoside 9 in Fig. 1), suggesting that the *N*-acetylglucosamine-asparagine core

Table 2. Minimum concentration of various oligosaccharidic structures necessary to completely inhibit red cell agglutination by lectins specific for α -mannose

For structures see Fig. 1 and 2. n.d., not determined

Compounds	Minimum concentration for inhibition with			
	concanavalin A	<i>Lens</i> lectin	<i>Vicia</i> lectin	<i>Pisum</i> lectin
	mM			
L-Fucose	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
Glucose	5	5	2.5	1.25
Mannose	1.25	2.5	0.625	0.625
Fructose	1.25	5	5	2.5
α -Methylglucose	1.25	2.5	1.25	1.25
α -Methylmannose	0.312	1.25	0.312	0.312
Human transferrin	0.002	0.0165	0.008	0.008
Human lactotransferrin	0.002	0.0005	0.0005	0.0005
Glycopeptide from human serotransferrin				
complete form	0.026	0.003	0.013	0.013
asialo form	0.026	0.003	0.013	0.013
asialogalacto form	0.015	>0.83	>0.83	>0.83
Glycopeptide from human lactotransferrin				
form 1	0.026	0.0004	0.0008	0.0008
form 2	0.026	0.0004	0.0008	0.0008
Sialoside 9	0.026	0.415	0.104	0.415
Asialo form of sialoside 9	0.013	0.104	0.052	0.415
Glycopeptide from bovine lactotransferrin	0.0015	0.052	0.207	0.104
Mannoside 1	0.104	0.83	0.104	n.d.
Mannoside 2	0.026	0.210	0.105	n.d.
Mannoside 3	0.026	0.206	0.105	n.d.
Oligosaccharide S-6a	0.0003	0.157	0.31	n.d.
Oligosaccharide S-5b	0.0003	0.157	0.58	n.d.
Sialoside 1	>0.83	>0.83	0.83	n.d.
Sialoside 2	0.207	0.415	0.312	>0.415
Asialo form of sialoside 2	0.207	0.207	0.207	>0.415
Sialoside 3	0.003	0.207	0.104	n.d.
Sialoside 4	0.013	0.415	0.415	n.d.
Sialoside 5	0.026	0.087	0.044	n.d.
Sialoside 6	0.006	0.026	0.026	n.d.
Glycopeptide from ovotransferrin	0.052	0.415	0.052	n.d.

sequence does not influence the reactivity of the saccharide-binding site of concanavalin A. However, it can be noted that the native glycoproteins are more potent inhibitors than the glycopeptides obtained from them by exhaustive pronase digestion: the glycopeptide derived from lactotransferrin is 12-fold less inhibitory than the native glycoprotein, as are those derived from human transferrin when compared to the native glycoprotein.

Substitution of the *N*-acetylglucosamine residue involved in the *N*-glycosidic linkage by an α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose (Fig. 2B) does not modify the affinity of concanavalin A as compared to the non-fucosylated glycopeptide (Fig. 2A).

All the results described above are in good agreement with the study carried out by Kornfeld et al. [3], using glycopeptides isolated from human myeloma proteins and with that described more recently by Baenziger et al. [23], who used the Scatchard method to follow the interaction between various iodinated glycopeptides and concanavalin A, and to determine the association constants of these interactions.

Our own results, as expressed in Table 2, can be compared to these association constants and, from our values, the affinity of a given saccharidic structure for concanavalin A immobilized on Sepharose 4B can be predicted.

Lens culinaris Agglutinin

The results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by *Lens* agglutinin are given in Table 2.

As shown in Fig. 3, the best inhibitor for *Lens* agglutinin is a glycopeptide isolated from human lactotransferrin (Fig. 2B). Another glycopeptide with an additional fucose residue (Fig. 2C) possesses the same inhibitory power.

Removal of all the fucose residues from these glycopeptides with an α -L-fucosidase from rat kidney gives glycopeptides about 10-fold less inhibitory, as is the glycopeptide isolated from human serotransferrin (Fig. 2A).

These results show the importance of the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose, as a major determinant of the binding. The α -(1 \rightarrow 3)-linked fucose on the external *N*-acetylglucosamine residue, as found in glycopeptide 2 from human lactotransferrin, does not seem to play any role in this binding. On the other hand, the results confirm those found by Allen et al. [24] who discovered that 3-*O*-methyl-D-glucose and 3-*O*-benzyl-D-glucose are better inhibitors than glucose itself, suggesting the existence of a hydrophobic area in or near the lectin-binding site, which can interact with the methyl or the benzyl groups. The methyl group provided by the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose would fit perfectly with this hydrophobic area.

In the case of concanavalin A, results had also shown the existence of a hydrophobic region close to the carbohydrate-binding site that could interact specifically with the phenyl groups of β -D-glucopyranosides [25], but our results show that the methyl group of L-fucose does not enhance the binding in this case. However, while the presence of an α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose near the *N*-glycosidic linkage seems to be a necessary condition for a maximal recognition of a saccharidic sequence by *Lens* agglutinin, it is not a sufficient one. In fact, glycopeptides possessing this α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose residue are not inhibitory (glycopeptides I and II of Fig. 1) or are very poorly inhibitory (glycopeptide III of Fig. 1). Moreover, the presence of terminal galactose residues seems to be necessary since in contrast to the asialo form, the asialo-galacto form of the glycopeptide of human serotransferrin is not inhibitory at all. In fact, removal of terminal sialic acid residues alone from the glycopeptide of human serotransferrin has no effect on the inhibitory activity as compared to the native glycopeptide. On the basis of these results, it can be concluded that *Lens* agglutinin recognizes bi-antennary *N*-acetylglucosaminic-type glycopeptide with galactose residues in a terminal non-reducing position, the binding being greatly enhanced by the presence of an α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose residue near the *N*-glycosidic linkage. These results can be compared with those published by Kornfeld et al. [26] who found that the most potent inhibitor for *Lens* agglutinin is a glycopeptide isolated from myeloma IgG which possesses the same glycan structure [3] as glycopeptide 1 of human lactotransferrin. These authors did not emphasize the importance of the presence of the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose near the *N*-glycosidic linkage for a maximal recognition by the lectin.

The glycopeptide isolated from bovine lactotransferrin which possesses the classical trimannosidic core substituted by four additional α -linked mannose residues (oligomannosidic-type structure) is 140-fold less inhibitory than glyco-

Table 3. Accessibility to some lectins of saccharidic sequences with α -(2 \rightarrow 3)-linked and α -(2 \rightarrow 6)-linked sialic acid residues
n.d., not determined

Compounds	Minimum concentration for inhibition with			
	<i>Lens</i> lectin	<i>Vicia</i> lectin	<i>Ricinus</i> lectin	
			I	II
	mM			
Neuraminyl- α -(2 \rightarrow 3)-lactose	> 1.66	> 1.66	0.625	n.d.
Neuraminyl- α -(2 \rightarrow 6)-lactose	> 1.66	> 1.66	0.156	n.d.
Sialoside 1	> 0.83	0.83	> 0.83	> 0.83
Sialoside 2	0.415	0.31	0.83	0.415
Sialoside 4	0.415	0.415	0.415	0.104
Sialoside 5	0.087	0.044	0.087	0.051

peptide 1 from human lactotransferrin and 17-fold less inhibitory than the glycopeptide from human serotransferrin. *Lens* agglutinin also shows very little affinity for saccharides with mannose residues in a terminal non-reducing position (mannosides 1, 2 and 3).

Another point which appears from these results is the importance of the *N*-acetylglucosamine-asparagine sequence in the binding reaction. Sialoside 9 which possesses the same oligosaccharidic sequence as human transferrin glycopeptide except for the *N*-acetylglucosamine-asparagine sequence, is about 130-fold less inhibitory than the glycopeptide itself. In this respect, *Lens* agglutinin differs from concanavalin A for which a glycopeptide and the corresponding oligosaccharide possess the same inhibitory power.

All these results are also in favor of the concept of an extended carbohydrate-binding site for *Lens* agglutinin.

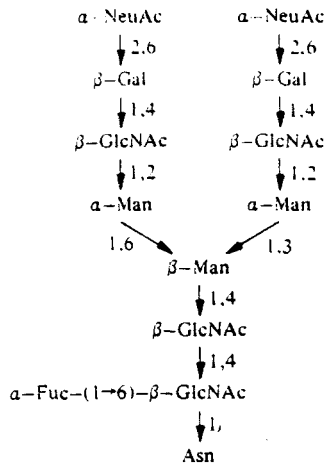
It can be noted that, in contrast to concanavalin A, with *Lens* agglutinin the native glycoproteins possess about the same inhibitory power as the glycopeptides derived from them by exhaustive pronase digestion.

Another important point, shown in Table 3, is that *Lens* agglutinin presents a greater affinity for sugar sequences substituted by sialic acid residues bound at the C-6 position of galactose rather than at the C-3 position. This observation can be related to the fact that an α -(2 \rightarrow 6)-linkage possesses a higher rotational freedom than α -(2 \rightarrow 3)-linkage [27, 28]. Thus, the saccharidic sequences recognized by the lectin are, in the case of an α -(2 \rightarrow 6)-linkage, more accessible to the lectin.

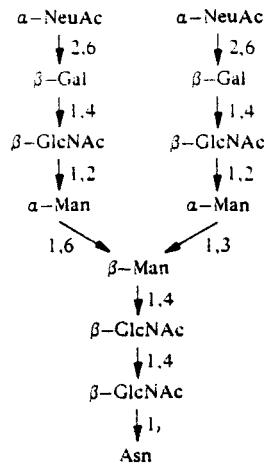
Vicia faba Agglutinin

The results concerning inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by *Vicia* agglutinin, are presented in Table 2 and in Fig. 3. They are very similar to those we obtained with *Lens* agglutinin. In fact, the best inhibitor found for *Vicia* agglutinin is glycopeptide 1 from human lactotransferrin with an α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose on the *N*-acetylglucosamine residue involved in the *N*-glycosidic linkage, and removal of this L-fucose residue gives a glycopeptide (like that from human serotransferrin) 17-fold less inhibitory. The results of Allen et al. [24], suggesting the existence of a hydrophobic zone in or near the carbohydrate-binding site

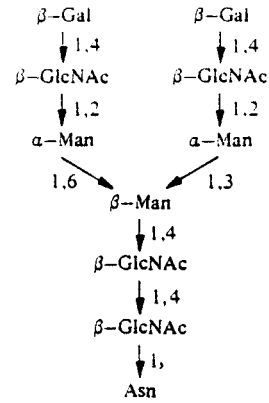
Glycopeptide 1 from human lactotransferrin



Glycopeptide from human serotransferrin



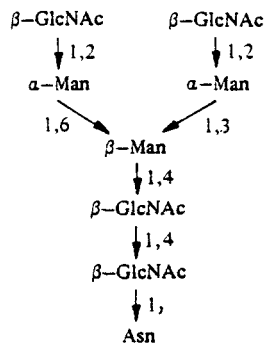
Asialo form of glycopeptide from human serotransferrin



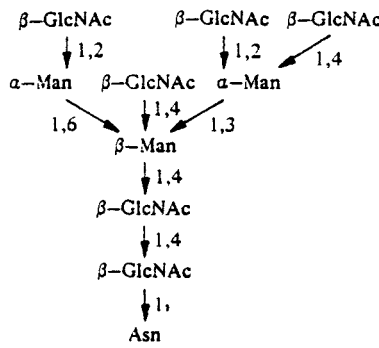
Inhibitory dose with

Concanavalin A	0.026 mM	0.026 mM	0.026 mM
<i>Lens</i> agglutinin	0.0004 mM	0.003 mM	0.003 mM
<i>Vicia</i> agglutinin	0.0008 mM	0.013 mM	0.013 mM
<i>Pisum</i> agglutinin	0.0008 mM	0.013 mM	0.013 mM

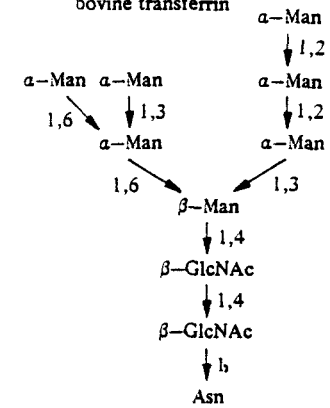
Asialoagalacto form of glycopeptide from human serotransferrin



Glycopeptide from ovotransferrin



Glycopeptide from bovine transferrin



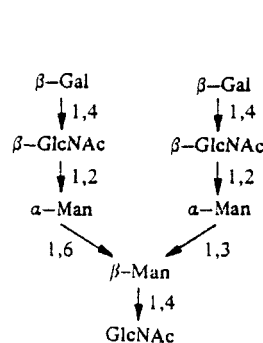
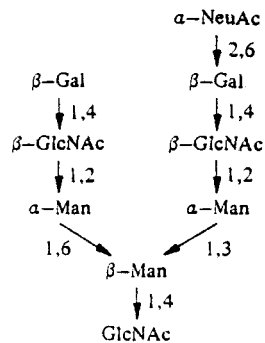
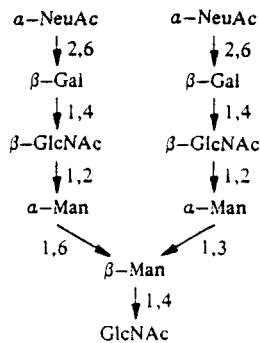
Inhibitory dose with

Concanavalin A	0.015 mM	0.052 mM	0.0015 mM
<i>Lens</i> agglutinin	> 0.83 mM	0.415 mM	0.052 mM
<i>Vicia</i> agglutinin	> 0.83 mM	0.052 mM	0.207 mM
<i>Pisum</i> agglutinin	> 0.83 mM	n.d.	0.104 mM

Sialoside 9

Sialoside 5

Asialo form of sialoside 9



Inhibitory dose with

Concanavalin A	0.026 mM	0.026 mM	0.013 mM
<i>Lens</i> agglutinin	0.415 mM	0.087 mM	0.104 mM
<i>Vicia</i> agglutinin	0.104 mM	0.044 mM	0.052 mM
<i>Pisum</i> agglutinin	0.415 mM	n.d.	0.415 mM

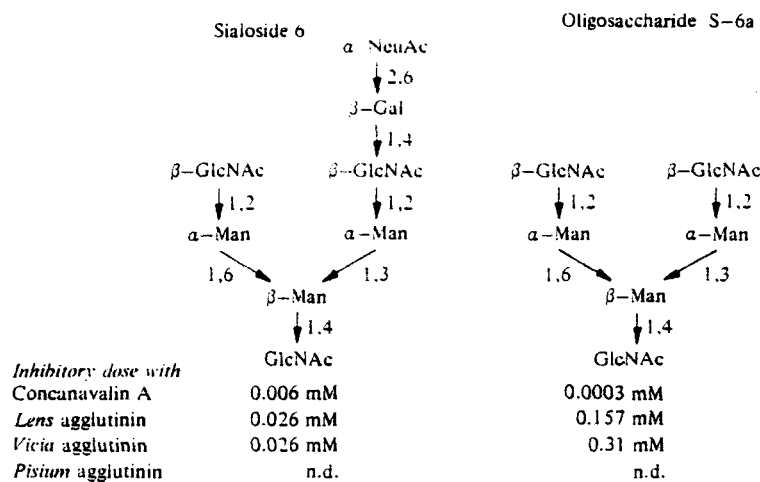


Fig. 3. Saccharidic determinants recognized by concanavalin A, and *Lens*, *Vicia* and *Pisum* agglutinins on glycans and oligosaccharides from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage. Results are expressed as the minimum concentration of sugar (mM) necessary to completely inhibit one hemagglutinating dose

of the lectin seem confirmed. The oligosaccharidic sequence recognized by *Vicia* agglutinin must possess N-acetylglucosamine residues and the trimannosidic core with the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose to fit perfectly with the combining site of the lectin, also suggesting a rather extended site. As shown in Table 3, *Vicia* agglutinin presents, as *Lens* agglutinin, a greater affinity for saccharidic sequences substituted by sialic acid residues bound in the C-6 position rather than in the C-3 position of galactose residues.

However, fine differences between the two lectins exist: the presence of the N-acetylglucosamine-asparagine sequence in the binding reaction of *Vicia* agglutinin does not seem to be as important as for *Lens* agglutinin since sialoside 9, derived from the human transferrin glycopeptide, is only eightfold less inhibitory. In the case of *Lens* agglutinin, it was 130-fold less inhibitory.

Pisum sativum Agglutinin

As for *Lens* and *Vicia* agglutinins, the best inhibitor found for *Pisum* agglutinin is also glycopeptide 1 from human lactotransferrin and as for the two other lectins, removal of the α -linked fucose residue gives a glycopeptide (like that from human serotransferrin) 17-fold less inhibitory (Fig. 3). These results are also in accord with those of Allen et al. [24] and Van Wauwe et al. [29] and are in favor of the existence of a hydrophobic area in or near the carbohydrate-binding site of the lectin. Moreover, as for *Vicia* agglutinin, the oligosaccharidic sequence recognized by *Pisum* agglutinin must possess N-acetylglucosamine sequences and the trimannosidic core, with this α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose residue to fit perfectly with the combining site of the lectin.

As in the case of *Vicia* agglutinin, sialoside 9 lacking the N-acetylglucosamine-asparagine sequence is also 32-fold less inhibitory than the glycopeptide itself (from human serotransferrin).

These results show that, if concanavalin A is quite different from the other three lectins, there are also fine differences between the *Lens*, *Vicia* and *Pisum* agglutinins as was previously pointed out [24].

Our results confirm for the last three lectins the existence of a hydrophobic area in or near the carbohydrate-binding site and this can be the cause of non-specific interactions

between the lectin and aromatic residues of glycopeptides or glycoproteins as described [30, 31] for concanavalin A.

LECTINS WITH A SPECIFICITY FOR GALACTOSE AND N-ACETYLGALACTOSAMINE

Ricinus communis Agglutinin I

Results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by *Ricinus* agglutinin I are presented in Table 4.

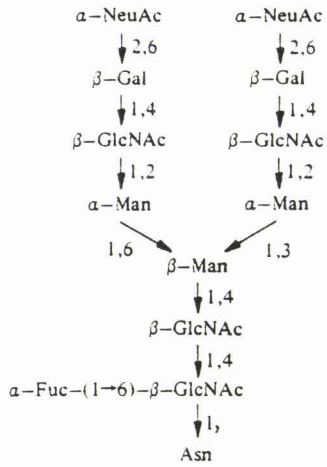
As shown in Fig. 4, the best inhibitor found for *Ricinus* agglutinin I is the asialo form of sialoside 9 which presents two β -(1 \rightarrow 4)-linked galactose residues very accessible to the lectin. Sialoside 5, which possesses only one such residue, sialoside 6 in which the two galactose residues are lacking and sialoside 9, in which the galactose residues are substituted by α -(2 \rightarrow 6)-linked sialic acid residues, are less inhibitory. These results show that *Ricinus* agglutinin I recognizes the N-acetylglucosamine sequence β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc. Oligosaccharides S-6a and S-5b, which possess the same core structure as the above sialosides but without any β -linked galactose residue, are not inhibitory at all.

As shown in Table 3, *Ricinus* agglutinin I shows a greater affinity for saccharidic sequences possessing galactose residue(s) substituted by sialic acid residue(s) in the C-6 position rather than in the C-3 position. These results we preliminarily reported [4, 5] have been confirmed in the meantime by Baenziger et al. [32]. Thus, as for the *Lens* and *Vicia* agglutinins, this observation can also be related to the higher rotational freedom of α -(2 \rightarrow 6)-linkage, leaving in the case of *Ricinus* agglutinin I an N-acetylglucosamine sequence more accessible to the lectin.

Sialylated glycopeptides (from human serotransferrin and lactotransferrin) possess the same inhibitory power, but they are twofold more inhibitory than sialoside 9, suggesting a more rigid spatial configuration for the glycopeptides, maintaining an appropriate orientation of the saccharide sequence recognized by the lectin, in contrast to a random orientation for the sialoside itself.

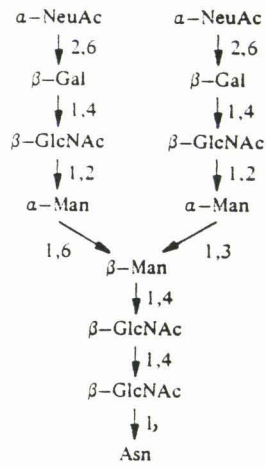
One can also note that the two glycopeptides isolated from human lactotransferrin possess the same inhibitory

Glycopeptide 1 from human lactotransferrin



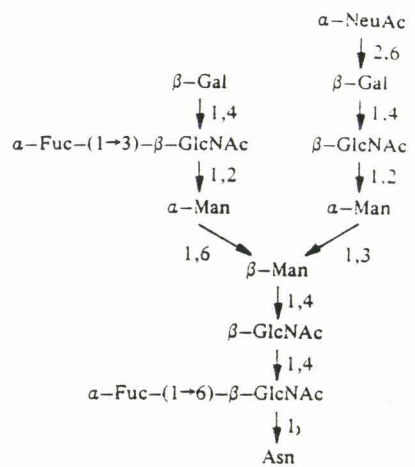
Inhibitory dose with
Ricinus agglutinin I 0.207 mM
Ricinus agglutinin II > 0.415 mM

Glycopeptide from human serotransferrin



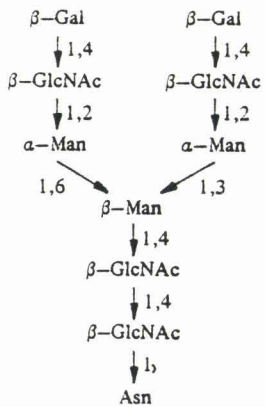
0.207 mM
 0.207 mM

Glycopeptide 2 from human lactotransferrin



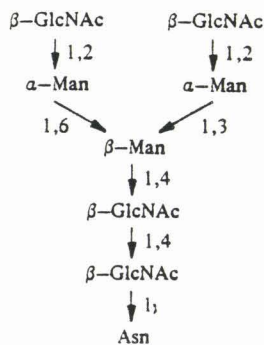
0.207 mM
 0.104 mM

Asialo form of glycopeptide from human serotransferrin



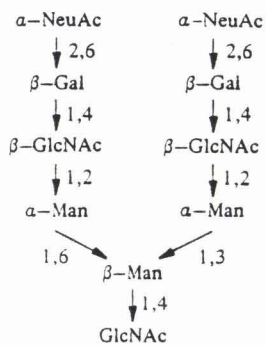
Inhibitory dose with
Ricinus agglutinin I 0.104 mM
Ricinus agglutinin II 0.104 mM

Asialoagalacto form of glycopeptide from human serotransferrin



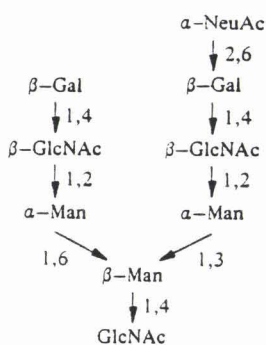
> 0.83 mM
 > 0.83 mM

Sialoside 9



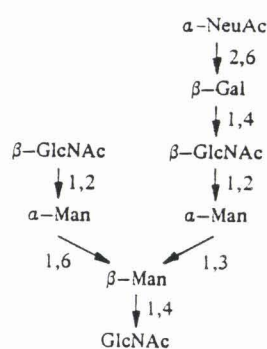
Inhibitory dose with
Ricinus agglutinin I 0.415 mM
Ricinus agglutinin II 0.104 mM

Sialoside 5



0.087 mM
 0.051 mM

Sialoside 6



0.415 mM
 0.104 mM

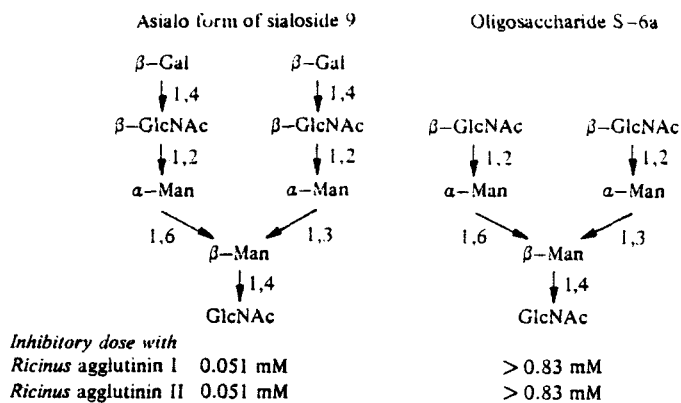


Fig. 4. Saccharidic determinants recognized by Ricinus agglutinins I and II on glycans or oligosaccharidic structures from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage. Results are expressed as the minimum concentration of sugar (mM) necessary to completely inhibit one hemagglutinating dose

power in spite of an unsubstituted β -galactose residue in the case of glycopeptide 2. The presence of the α -(1 \rightarrow 3)-linked fucose on the N-acetylglucosamine residue seems in this case to limit the accessibility of the N-acetylglucosamine sequence to the lectin.

Removal of the α -(2 \rightarrow 6)-linked sialic acid residues from the human serotransferrin glycopeptide (asialo form) increases the inhibitory power twofold when compared to the sialylated form. Moreover, treatment of the desialylated product with β -D-galactosidase completely abolishes its inhibitory capacity.

It can also be noted that sialylated glycopeptides isolated from human transferrin and lactotransferrin possess the same inhibitory power. Thus, the fucose residue α -(1 \rightarrow 6)-linked to the N-acetylglucosamine residue conjugated to asparagine seems to have no particular effect on the binding with the lectin. This result is in contrast to those of Adair and Kornfeld [33] who have found that a glycopeptide isolated from human IgG whose glycan structure is identical to that of the glycopeptide isolated from human lactotransferrin, was about threefold more inhibitory than the glycopeptide isolated from human transferrin, which lacks the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose near the N-glycosidic linkage.

Ricinus communis Agglutinin II

Results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by Ricinus agglutinin II are presented in Table 4.

An important point is that the toxin Ricinus agglutinin II, is inhibited by N-acetylgalactosamine whereas Ricinus agglutinin I is not. Otherwise, the carbohydrate-binding specificity of lectin II towards N-glycosidic-derived structures is very similar to that of lectin I: as shown in Fig. 4, the best inhibitor for Ricinus agglutinin II is also the desialylated sialoside 9 which presents two β -(1 \rightarrow 4)-linked galactose residues very accessible to the lectin.

As for the lectin I, Ricinus agglutinin II also presents a greater affinity for saccharidic sequences with galactose residues substituted by α -(2 \rightarrow 6)-linked rather than by α -(2 \rightarrow 3)-linked sialic acid residues. These results differ from those of Baenziger et al. [32] who found indirectly, that in contrast to lectin I, lectin II could recognize both C-3 and C-6 substituted galactose residues in an N-glycosyl-type structure. However, in the same study, these authors found that neither lectin bound to O-glycosyl-type structures with sialic acid α -(2 \rightarrow 3)-linked to the β -Gal-(1 \rightarrow 3)-GalNAc units.

Table 4. Minimum concentration of various oligosaccharidic structures necessary to completely inhibit red cell agglutination by lectins specific for galactose and N-acetylgalactosamine n.d., not determined. For structures see Fig. 1 and 2

Compounds	Minimum concentration for inhibition with		
	Ricinus lectin		soybean lectin
	I	II	
mM			
Galactose	2.5	0.625	1.25
N-Acetylgalactosamine	> 5	0.312	0.019
Lactose	1.25	0.155	1.25
Melibiose	2.5	0.625	0.625
Human transferrin	> 0.008	> 0.008	> 0.008
Human lactotransferrin	> 0.008	> 0.008	> 0.008
Glycopeptide from human serotransferrin			
complete form	0.207	0.207	> 0.415
asialo form	0.104	0.104	0.415
asialoagalacto form	> 0.83	> 0.83	> 0.83
Glycopeptide from human lactotransferrin			
form 1	0.207	> 0.415	> 0.415
form 2	0.207	0.104	> 0.415
Neuraminyl-(α 2 \rightarrow 3)-lactose	0.625	n.d.	n.d.
Neuraminyl-(α 2 \rightarrow 6)-lactose	0.156	n.d.	n.d.
Oligosaccharide S-6a	> 0.83	> 0.83	n.d.
Oligosaccharide S-5b	> 0.83	> 0.83	n.d.
Sialoside 1	> 0.83	> 0.83	> 0.83
Sialoside 2	0.83	0.415	> 0.83
Asialo form of sialoside 2	0.415	0.207	0.415
Sialoside 3	0.83	0.312	> 0.83
Sialoside 4	0.415	0.104	> 0.83
Sialoside 5	0.087	0.051	0.415
Sialoside 6	0.415	0.104	> 0.83
Sialoside 9	0.415	0.104	0.415
Asialo form of sialoside 9	0.051	0.051	0.415

If the affinity of lectin II for N-acetyllactosaminic structures seems very similar to those of isolectin I, our results show that fine differences between the two lectins exist.

In contrast to the lectin I, Ricinus agglutinin II does not seem to require a proper orientation of the saccharidic

sequence recognized by the lectin, for sialoside 9 which possesses a random configuration as compared to the sialylated glycopeptide isolated from human transferrin is in fact two-fold more inhibitory.

It is also interesting to compare the inhibitory power of the glycopeptide from human serotransferrin to that of glycopeptides 1 and 2 from human lactotransferrin. The substitution of the *N*-acetylglucosamine residue taking part in the glycosylamine linkage by an α -(1→6)-linked fucose residue decreases the inhibitory power of this glycopeptide at least twofold. This result is also in contrast to that of Adair and Kornfeld [33] who have found that a glycopeptide isolated from human IgG was about four-fold more inhibitory than the glycopeptide isolated from human transferrin.

On the other hand, glycopeptide 2 from human lactotransferrin is at least fourfold more inhibitory than glycopeptide 1 from the same source. Here, in contrast to *Ricinus* agglutinin I, the α -(1→3)-linked fucose on the *N*-acetylglucosamine residue does not seem to limit the accessibility of the unsubstituted β -galactose residue to the lectin.

Differences between the two lectins towards glycopeptides with an *O*-glycosidic linkage, bearing β -Gal-(1→3)-GalNAc sequences have also been characterized by Baenziger et al. [32]. According to their results, *Ricinus* agglutinin II binds glycopeptides containing this sequence with greater association constant than agglutinin I, and can bind glycopeptides with terminal *N*-acetylgalactosamine residues, while agglutinin I cannot.

Soybean Agglutinin

Results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by soybean agglutinin are presented in Table 4.

The best inhibitor is *N*-acetylgalactosamine itself. Galactose and lactose are 70-fold less inhibitory than this sugar, and melibiose with a terminal non-reducing α -linked galactose is twofold more inhibitory than lactose.

These results are in good agreement with those of Pereira et al. [34] and Hammarström et al. [35] and confirm that soybean agglutinin presents the greatest affinity for *N*-acetylgalactosamine residues.

Desialylated glycopeptides or oligosaccharides (asialo form of the glycopeptide from human serotransferrin, asialo form of sialoside 9) of the *N*-acetylglucosaminic type, possessing exposed non-reducing β -(1→4)-linked galactose residues are slightly inhibitory as shown previously [36]. However enzymatic removal of these galactose residues (the asialoagalacto form of the glycopeptide from human serotransferrin) results in a complete loss of their inhibitory power. This point is contrary to the results of Irimura et al. [36] who find that porcine thyroglobulin β -glycopeptide, from which both sialic acid and galactose residues have been enzymically removed, is as good an inhibitor for soybean agglutinin as the desialylated glycopeptide.

LECTINS WITH A SPECIFICITY FOR *N*-ACETYLGLUCOSAMINE

Wheat-Germ Agglutinin

Results concerning the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by wheat-germ agglutinin, are presented in Table 5 and in Fig. 5.

Table 5. Minimum concentration of various oligosaccharidic structures necessary to completely inhibit red blood cell agglutination by lectins specific for *N*-acetylglucosamine

Compounds	Minimum concentration for inhibition with lectin from		
	wheat germ	<i>Solanum</i>	<i>Datura</i>
	mM		
<i>N</i> -Acetylglucosamine	> 15	> 15	> 15
Chitobiose	0.4	1.85	> 1.85
Chitotriose	0.0375	0.015	0.19
Human transferrin	> 0.008	> 0.008	> 0.008
Human lactotransferrin	> 0.008	> 0.008	> 0.008
Glycopeptide from human serotransferrin			
complete form	> 0.415	> 0.415	0.415
asialoagalacto form	> 0.415	> 0.415	> 0.415
Glycopeptide from human lactotransferrin			
form 1	> 0.415	0.207	0.207
form 2	> 0.415	0.207	0.207
Glycopeptide from hen ovomucoid	0.65	0.104	0.026
Glycopeptide from ovotransferrin	> 0.415	0.415	0.052
Sialoside 2	> 0.415	0.415	> 0.415
Asialo form of sialoside 2	> 0.415	0.415	> 0.415
Sialoside 9	> 0.415	0.207	> 0.415
Asialo form of sialoside 9	> 0.415	> 0.415	> 0.415

The best inhibitor is chitotriose, chitobiose being 10-fold and *N*-acetylglucosamine 100-fold less inhibitory. These results are in agreement with those of Allen et al. [37], Goldstein et al. [38] and Monsigny et al. [39] showing that the combining site of wheat-germ agglutinin appears to be complementary to a sequence of three β -(1→4)-linked *N*-acetylglucosamine residues.

Of the various oligosaccharidic structures examined for their capacity to inhibit wheat-germ agglutinin, only the β -glycopeptide isolated from ovomucoid (see Fig. 2) shows a weak inhibitory activity. This glycopeptide contains the chitobiose sequence attached to asparagine by a glycosylamine linkage and possesses five exposed non-reducing *N*-acetylglucosamine residues. On the other hand, neither a glycopeptide isolated from ovotransferrin which possesses the same core sequence and only four exposed non-reducing *N*-acetylglucosamine residues, nor the asialoagalacto form of glycopeptide isolated from human serotransferrin, and also possessing the same core sequence but only two exposed non-reducing *N*-acetylglucosamine residues, are inhibitory.

However, Goldstein et al. [38] have found that wheat-germ agglutinin could interact with the glyco-asparagines β -Man-(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)- β -GlcNAc-(1→)-Asn and β -GlcNAc-(1→4)- β -GlcNAc-(1→)-Asn with equivalent inhibitory power to chitobiose, suggesting that in the case of the two last glycopeptides, this common chitobiose-asparagine sequence is no more accessible to the lectin. Recently, it has been shown [40,42] that wheat-germ agglutinin is able to interact specifically with non-reducing terminal *N*-acetylneuraminic acid residues of glycoproteins and glycolipids, because of the structural similarity due to the acetamido group of *N*-acetylneuraminic acid, and to a lesser degree with *N*-acetylgalactosamine. These interactions also involved

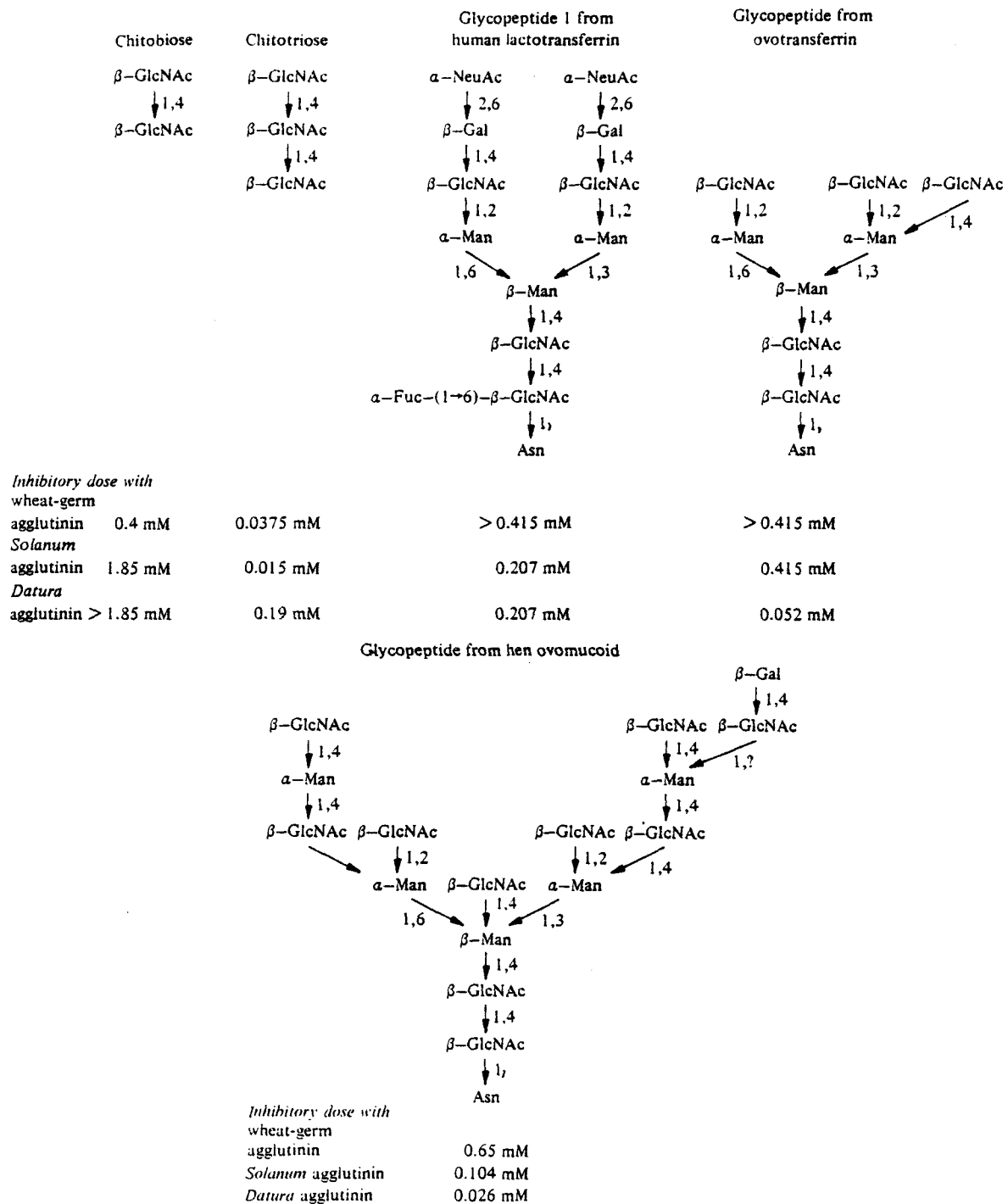


Fig. 5. Saccharidic determinants recognized by agglutinins from wheat germ. *Solanum* and *Datura* agglutinins on glycans and oligosaccharides from various glycoproteins. Results are expressed as the minimum concentration of sugar (mM) necessary to completely inhibit one hemagglutinating dose

a charge effect and what Monsigny et al. [41] call an 'avidity effect': glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids or glycopeptides) with a high density of terminal non-reducing *N*-acetylglucosamine or *N*-acetylneuraminic acid residues will interact with wheat-germ agglutinin. This may be the case in the interaction with the β -glycopeptide isolated from ovomucoid which possesses five external non-reducing *N*-acetylglucosamine residues.

On the other hand, glycopeptides or oligosaccharides such as the glycopeptide from human serotransferrin or sialoside 9, which possess only two external *N*-acetylneuraminic acid residues, or the asialoagalacto form of the glycopeptide from

human serotransferrin which possesses only two exposed non-reducing *N*-acetylglucosamine residues, are not inhibitory.

All these results show that the interactions between wheat-germ agglutinin and cell-surface glycoconjugates are very complex and have to be interpreted very carefully.

Solanum tuberosum Agglutinin

Results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by *Solanum* agglutinin, are shown in Table 5 and in Fig. 5.

The best inhibitor is, as for wheat-germ agglutinin, the chitotriose, chitobiose being 120-fold and *N*-acetyl-D-glucosamine at least 1000-fold less inhibitory. These results are slightly different from those of Allen et al. [43] who find that chitotriose is only twofold more inhibitory than chitobiose and that the best inhibitory is chitotetraose, suggesting that the *Solanum* agglutinin possesses an extended binding site as proposed for wheat-germ agglutinin [37].

Glycopeptide 1 from human lactotransferrin is ninefold more inhibitory than chitobiose, whereas the glycopeptide from human serotransferrin is not inhibitory at a maximal concentration of 0.415 mM. This result suggests that there is a hydrophobic area in or near the lectin-binding site which can interact with the methyl group of L-fucose in association with the recognition of the chitobiose sequence.

Like wheat-germ agglutinin, the *Solanum* agglutinin can bind external non-reducing *N*-acetylglucosamine residues, but only if there is a high density of such residues near the binding site: the β -glycopeptide isolated from ovomucoid, which possesses five external non-reducing *N*-acetylglucosamine residues is 18-fold more inhibitory than chitobiose. The glycopeptide from ovotransferrin, which possesses four such residues is fourfold less inhibitory and the asialoagalacto form of glycopeptide from human serotransferrin which possesses only two external *N*-acetylglucosamine residues is not inhibitory at a concentration of 0.415 mM.

As in the case of wheat-germ agglutinin, the binding site of *Solanum* agglutinin seems to be able to interact with non-reducing terminal *N*-acetylneuraminic acid residues, since sialoside 9, which possesses two such residues, is ninefold more inhibitory than chitobiose. However, it remains difficult to explain why the glycopeptide from human serotransferrin, which also possesses two external non-reducing *N*-acetylneuraminic acid residues, is not inhibitory at a maximal concentration of 0.415 mM.

Datura stramonium Agglutinin

As shown in Table 5, the best inhibitor is the β -glycopeptide isolated from ovomucoid which possesses five external non-reducing *N*-acetylglucosamine residues. The glycopeptide from ovotransferrin possessing only four of such *N*-acetylglucosamine residues is twofold less inhibitory and the asialoagalacto form of glycopeptide from human serotransferrin which possesses two external non-reducing *N*-acetylglucosamine residues is not inhibitory at a maximal concentration of 0.415 mM.

These results suggest that *Datura* agglutinin interacts with terminal non-reducing *N*-acetylglucosamine residues, but as for the wheat-germ and *Solanum* agglutinins, a high density of such residues seems to be necessary. *N*-acetylglucosamine itself is not inhibitory at a maximal concentration of 15 mM. Chitobiose and chitotriose are poor inhibitors for *Datura* agglutinin. Moreover, it has been found recently [44] that chitotetraose is fivefold more inhibitory than chitotriose, suggesting, as for the wheat-germ and *Solanum* agglutinins, an extended carbohydrate-binding site. The fact that glycopeptides 1 and 2 from human lactotransferrin are twofold more inhibitory than the glycopeptide from human serotransferrin suggests, as for the other lectins, a hydrophobic area in or near the lectin-binding site which could interact with the methyl group of L-fucose in association with the recognition of the chitobiose core sequence. In conclusion, the comparative study of the specificity of the three *N*-acetylglucosamine-binding lectins from wheat-germ, *Solanum* and *Datura*, shows

Table 6. Minimum concentration of various oligosaccharidic structures necessary to completely inhibit red blood cell agglutination by lectins specific for L-fucose

Compounds	Minimum concentration for inhibition with	
	<i>Lotus</i> lectin	<i>Ulex</i> lectin I
	mM	
L-Fucose	0.17	1.25
Human transferrin	> 0.008	> 0.008
Human lactotransferrin	> 0.008	> 0.008
Glycopeptide from human serotransferrin	> 0.415	> 0.415
Glycopeptide from human lactotransferrin		
form 1	0.415	> 0.415
form 2	0.207	> 0.415
Glycopeptide I	0.052	0.312
Glycopeptide II	0.207	> 0.415
Glycopeptide III	0.026	0.026
Fucoside 1	0.052	0.83
Fucoside 2	> 0.415	> 0.415
Sialoside 9	> 0.83	> 0.83

that very fine differences in their affinity towards defined saccharidic sequences exist.

LECTINS WITH A SPECIFICITY FOR L-FUCOSE

Lotus tetragonolobus Agglutinin

As shown in Table 6, the best inhibitor is the penta-fucosylated glycopeptide III (Fig.1) which possesses four external non-reducing fucose residues α -(1 \rightarrow 3)-linked to the *N*-acetylglucosamine of the four *N*-acetylglucosamine branches and one fucose residue α -(1 \rightarrow 6)-linked to the *N*-acetylglucosamine of the glycosylamine linkage.

Since L-fucose itself is less inhibitory than glycopeptides III, I and fucoside 1, the specificity of *Lotus* agglutinin seems to be directed towards the α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose residue.

However, substitution of the structure of glycopeptide I decreases the inhibitory power of the glycopeptide: in fact, glycopeptide II is fourfold less inhibitory than fucoside 1 or glycopeptide I and glycopeptides 1 and 2 from human lactotransferrin which possess an α -(1 \rightarrow 6)-linked fucose residue are eightfold less inhibitory. This finding seems, to indicate that substitution of the α -Fuc-(1 \rightarrow 6)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn sequence limits the accessibility of this structure to the lectin. A similar conclusion is described by Pereira et al. [17] who have shown, using blood-group-active substances, related oligosaccharides isolated from urine and milk as well as various derivatives of L-fucose, that *Lotus* agglutinin is strongly specific for unsubstituted 'type-2 chains' containing an α -(1 \rightarrow 2)-linked fucose residue on the terminal galactose, with or without another α -(1 \rightarrow 3)-linked fucose residue substituting the penultimate *N*-acetylglucosamine residue. Substitution of the terminal non-reducing galactose with α -(1 \rightarrow 3)-linked galactose destroys the inhibitory activity of the oligosaccharide, due to an inaccessibility of the α -(1 \rightarrow 2)-linked fucose to the lectin.

The same authors have also shown that unsubstituted 'type-1 chains', possessing the same fucose substitutes but a β -Gal-(1 \rightarrow 3)-GlcNAc or β -Gal-(1 \rightarrow 3)-Glc core instead of

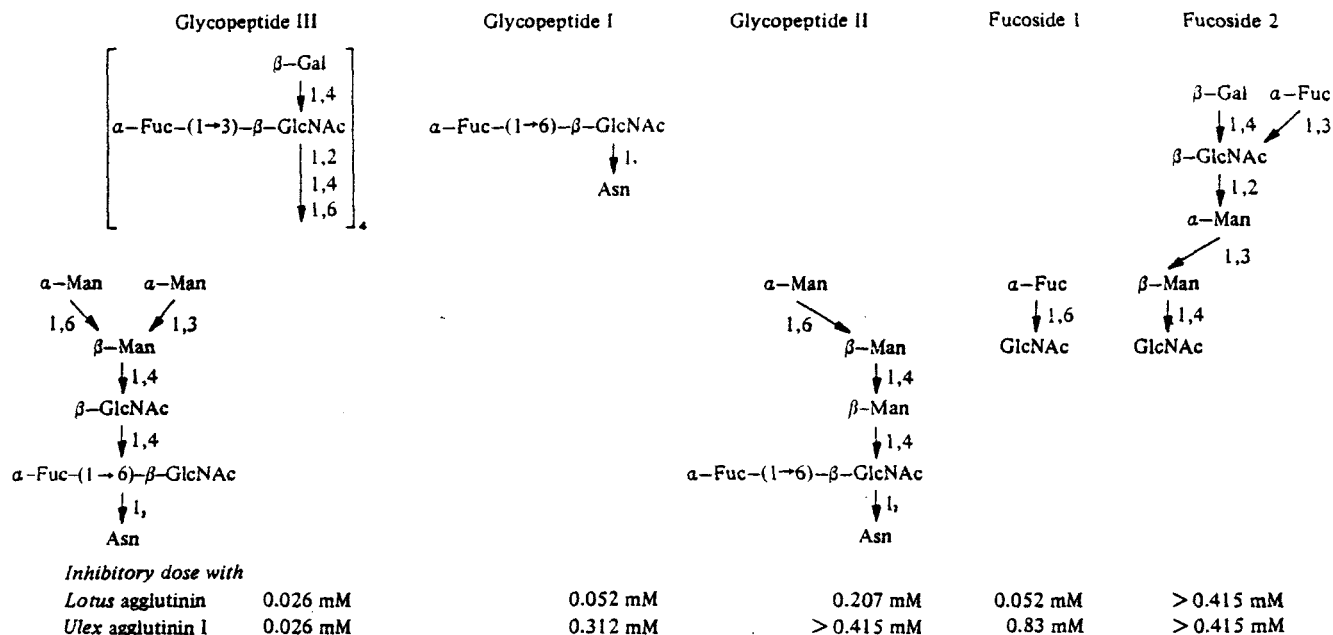


Fig. 6. Saccharidic determinants recognized by *Lotus agglutinin* and *Ulex agglutinin I* on glycans and oligosaccharides from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage. Results are expressed as the minimum concentration of sugar (mM) necessary to completely inhibit one hemagglutinating dose

the β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc or β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc core found in 'type-2 chains', are not inhibitory and this can also be explained by a spatial configuration of this core which makes the L-fucose residue inaccessible to the lectin.

In our results, it is noteworthy that fucoside 2 which lacks the α -Fuc-(1 \rightarrow 6)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn sequence but possesses an external fucose α -(1 \rightarrow 3)-linked to an N-acetylglucosamine residue, is not inhibitory at a maximal concentration of 0.415 mM. However, glycopeptide 2 from human lactotransferrin is twofold more inhibitory than glycopeptide 1 from the same source. This result seems to indicate, in the case of glycopeptide 2 from human lactotransferrin and glycopeptide III, the existence of an 'avidity effect' [41] in the interaction between *Lotus agglutinin* and these glycopeptides. The same result is also described by Pereira et al. [17] who have found that a difucosyl substituted 'type-2 chain' is twofold more inhibitory than the monosubstituted 'type-2 chain' oligosaccharide.

Ulex europaeus Agglutinin

Results of the inhibition by various oligosaccharidic structures of hemagglutination by *Ulex agglutinin I* are shown in Table 6 and Fig. 6.

As found previously [45], the major differences between the *Lotus agglutinin* and *Ulex agglutinin I* are that the latter presents higher affinity for type-O human red blood cells and that higher concentrations of inhibitors are necessary to obtain a complete hemagglutination inhibition in the presence of *Ulex agglutinin I*.

As for *Lotus agglutinin*, the best inhibitor found for *Ulex agglutinin* is glycopeptide III (Fig. 1). L-Fucose is a poor inhibitor and is 48-fold less inhibitory than glycopeptide III. As for *Lotus agglutinin*, substitution of the α -Fuc-(1 \rightarrow 6)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn sequence decreases its inhibitory power, indicating limited accessibility to the lectin. Fucoside 2 which

lacks this sequence, but possesses an external fucose α -(1 \rightarrow 3)-linked to an N-acetylglucosamine residue is not inhibitory at a maximal concentration of 0.415 mM. The relatively high inhibitory power of glycopeptide III can be then explained by the existence of an 'avidity effect'.

Recently, Pereira et al. [46], using various blood-group and milk oligosaccharides, has shown that the best inhibitor for *Ulex agglutinin I* is a blood-group-H monofucosyl oligosaccharide of the 'type-2 chain': α -Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6)-R. This oligosaccharide is 900-fold more inhibitory than α -L-fucose itself. In contrast to the *Lotus* lectin, the addition of a second L-fucose α -(1 \rightarrow 3)-linked to the N-acetylglucosamine or glucose residue reduces the inhibitory power of the oligosaccharide. This is why fucosyl oligosaccharides with 'type-1 chains' are as good inhibitors for *Ulex agglutinin I* as are fucosyl oligosaccharides with 'type-2 chains'.

All these results show that these two L-fucose-binding lectins, *Lotus agglutinin* and *Ulex agglutinin I* can be also very useful to characterize very fine differences in the glycan structure of cell-surface glycoconjugates.

CONCLUSIONS

This work represents a very indirect approach to the problem of lectin specificity since the best saccharide inhibitor found for a given lectin does not necessarily represent the true glycan site recognized by this lectin on a cell-surface glycoconjugate. In this connection, Adair et al. [33] have shown that surface glycopeptides isolated from red blood cells are 1200-fold more inhibitory for *Ricinus communis agglutinin I* than galactose itself. However in spite of this restriction, our results provide information on the specificities of some lectins commonly used as probes in the study of membrane glycoconjugates or for the fractionation of membrane glycoproteins. These results show that lectins con-

sidered 'identical' in terms of monosaccharide specificity, possess the ability to recognize fine differences in more complex structures.

Moreover, our results show that different lectins are able to recognize different saccharidic sequences, but belonging to the same glycan structure. As these sequences are likely to be common to numerous glycoproteins, including cell-membrane glycoproteins, the use of some of the lectins as a tool in the study of cell-surface carbohydrates seems to be limited. The same conclusion was drawn by Nilsson et al. [47] who found that different lectins bind to the same cell-surface glycoproteins. Kimura et al. [48] also arrive at this conclusion and show that commonly used lectins such as concanavalin A, *Lens* and wheat-germ agglutinins and *Ricinus* agglutinin I react with a broad spectrum of lymphocyte cell-surface glycoproteins.

The relative affinity of a lectin for a given glycan structure, as expressed in the different tables, can be compared with the true association constant of the lectin for this glycan: the lower is the minimum amount of the glycan necessary to inhibit hemagglutination by this lectin, the higher is the association constant of the lectin for this saccharide. Moreover, from these results, the ability of a given lectin insolubilized on Sepharose to fractionate oligosaccharides or glycopeptides containing the saccharide sequence recognized by the lectin can be predicted.

In addition, our results confirm previous data concerning the spatial configuration of the glycan moiety of glycoproteins. In fact, many lectins (*Lens* and *Vicia* agglutinins, and *Ricinus* agglutinins I and II) present a greater affinity for saccharidic sequences substituted by sialic acid residues bound in the α -(2 \rightarrow 6) position of galactose rather than in the α -(2 \rightarrow 3) position and this can be related to the high rotational freedom of α -(2 \rightarrow 6)-linkage. Some lectins with an extended binding site, such as *Lens*, *Vicia* and *Pisum* agglutinins, react to a greater extent with their specific oligosaccharidic sequence, when this sequence belongs to a glycopeptide possessing the chitobiose-asparagine core than with the derived oligosaccharides lacking the β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn sequence. These results can be related to the fact that the chitobiose core gives to the whole glycan a more rigid conformation as opposed to the random configuration of the derived oligosaccharide; however, the presence of charges on asparagine could also be involved in the binding.

Finally, our results show that many lectins (from *Lens*, *Vicia*, *Pisum*, *Solanum* and *Datura*) seem to possess in or near their carbohydrate-binding site, a hydrophobic area such as that described for concanavalin A [25] and this could be the cause of non-specific hydrophobic interactions between the lectin and residues of glycopeptides or glycoproteins, as described for concanavalin A [30,31].

This work was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique* L.A. 217: *Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires* and R.C.P. 529: *Glucides et Glycoconjugués*, by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (U 124: *Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses*) and by the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique* (Action concertée: *Cancérogenèse et Pharmacologie du Cancer*, Contract 79-7-0669). We are indebted to Prof. Michel Monsigny for his gift of potato agglutinin, to Dr André Chéron for providing bovine milk lactotransferrin glycopeptide and to Mrs Renée Debray-Vandersyppe and Monique Benaïssa for their skilful technical assistance. Thanks are due to Prof. Michel Monsigny and Prof. Nathan Sharon for helpful advice and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Lis, H. & Sharon, N. (1977) in *The Antigens* (Sela, M., ed.) vol. 4, pp. 429–529. Academic Press, New York.
- Goldstein, I. J. & Hayes, C. E. (1978) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127–340.
- Kornfeld, R. & Ferris, C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2614–2619.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Montreuil, J. & Monsigny, M. (1978) *Proc. 9th Int. Symp. Carbohydr. Chem.* 385–386.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Montreuil, J. & Monsigny, M. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. Brussels*, 27, 451–454.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680–685.
- Toyoshima, S., Osawa, T. & Tonomura, A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 514–521.
- Howard, I. K., Sage, H. J., Stein, M. D., Young, N. M., Leon, M. A. & Dyckes, D. F. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1590–1595.
- Allen, H. J. & Johnson, E. A. Z. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 444, 374–385.
- Entlicher, G., Kostir, J. V. & Kocourek, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 272–281.
- Nicolson, G. L., Blaustein, J. & Etzler, M. E. (1974) *Biochemistry*, 13, 196–204.
- Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H. & Sharon, N. (1972) *FEBS Lett.* 24, 193–196.
- Lotan, R., Gussin, A. E. S., Lis, H. & Sharon, N. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 656–662.
- Delmotte, F., Kieda, C. & Monsigny, M. (1975) *FEBS Lett.* 53, 324–330.
- Blumberg, S., Hildesheim, J., Yariv, J. & Wilson, K. J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 171–176.
- Kalib, A. J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 532–536.
- Pereira, M. E. A. & Kabat, E. A. (1974) *Biochemistry*, 13, 3184–3192.
- Flory, L. L. (1966) *Vox Sang.* 11, 137–156.
- Matsumoto, I. & Osawa, T. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 484–491.
- Strecker, G. & Montreuil, J. (1979) *Biochimie (Paris)* 61, 1199–1246.
- Montreuil, J. (1975) *Pure Appl. Chem.* 42, 431–477.
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* 50, 296–299.
- Baenziger, J. U. & Fiete, D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2400–2407.
- Allen, A. K., Desai, N. N. & Neuberger, A. (1976) *Biochem. J.* 155, 127–135.
- Loontjens, F. G., Van Wauwe, J. P., De Gussem, R. & De Bruyne, C. K. (1973) *Carbohydr. Res.* 30, 51–62.
- Kornfeld, S., Rogers, J. & Gregory, W. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6581–6586.
- Montreuil, J., Fournet, B., Spik, G. & Strecker, G. (1978) *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat.* 287, 837–840.
- Montreuil, J. & Vliegthart, J. F. G. (1979) *Proc. 5th Int. Symp. Glycoconjugates*, 1, 35–78.
- Van Wauwe, J. P., Loontjens, F. G. & De Bruyne, C. K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 456–461.
- Davey, M. W., Huang, J. W., Sulkowski, E. & Carter, W. A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6354–6355.
- Davey, M. W., Sulkowski, E. & Carter, W. A. (1976) *Biochemistry*, 15, 704–713.
- Baenziger, J. U. & Fiete, D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9795–9799.
- Adair, W. L. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4696–4704.
- Pereira, M. E. A., Kabat, E. A. & Sharon, N. (1974) *Carbohydr. Res.* 37, 89–102.
- Hammarström, S., Murphy, L. A., Goldstein, I. J. & Etzler, M. E. (1977) *Biochemistry*, 16, 2750–2755.
- Irimura, T., Kawaguchi, T., Terao, T. & Osawa, T. (1975) *Carbohydr. Res.* 39, 317–327.
- Allen, A. K., Neuberger, A. & Sharon, N. (1973) *Biochem. J.* 131, 155–162.
- Goldstein, I. J., Hammarström, S. & Sundblad, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 405, 53–61.
- Monsigny, M., Delmotte, F. & Helene, C. (1978) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 75, 1324–1328.

40. Bhavanandan, V. P. & Katlic, A. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4000-4008.
41. Monsigny, M., Roche, A. C., Sene, C., Maquet-Dana, R. & Delmotte, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 104, 147-153.
42. Peters, B. P., Ebisu, S., Goldstein, I. J. & Flashner, M. (1979) *Biochemistry*, 18, 5505-5511.
43. Allen, A. K. & Neuberger, A. (1973) *Biochem. J.* 135, 307-314.
44. Kilpatrick, D. C. & Yeoman, M. M. (1978) *Biochem. J.* 175, 1151-1153.
45. Allen, H. J., Johnson, E. A. Z. & Matta, K. L. (1977) *Immunol. Commun.* 6, 585-602.
46. Pereira, M. E. A., Kisailus, E. C., Gruczo, F. Kabat, E. A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 108-115.
47. Nilsson, S. F. & Waxdal, M. J. (1978) *Biochemistry*, 17, 903-910.
48. Kimura, A., Wigzell, H., Holmquist, G., Ersson, B. & Carlsson, P. (1979) *J. Exp. Med.* 149, 473-484.

H. Debray*, D. Decout, G. Strecker, G. Spik, and J. Montreuil, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Boîte postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

* To whom correspondence should be addressed.

CONCLUSIONS.

Nous pouvons résumer les résultats que nous avons obtenus sur la spécificité des lectines en solution de la manière suivante.

1/ Rarement un monosaccharide en position terminale sur un glycanne sera reconnu par une lectine. Ainsi, la lectine de graine de ricin RCA_1 ne reconnaît pas seulement les résidus de galactose en position terminale non réductrice sur un glycanne lié N-glycosidiquement, mais reconnaît les séquences N-acétyllactosaminiques et $NeuAc(\alpha 2-6)Gal(\beta 1-4)GlcNAc$ de ce glycanne.

De même, la Concanavaline A, bien que reconnaissant les résidus d' α -mannose en position terminale non réductrice sur des glycanes de type oligomannosidique, présente une très forte affinité pour une séquence oligosaccharidique interne $GlcNAc(\beta 1-2)Man(\alpha 1-)$ appartenant à des glycanes de type N-acétyllactosaminique biantennés.

2/ Des lectines considérées comme identiques, en terme de reconnaissance d'un monosaccharide, peuvent posséder des spécificités totalement différentes envers des structures glycaniques plus complexes.

Ainsi, nous avons montré que la Concanavaline A d'une part, et les lectines de Lentille (LCA), de Pois (PSA), de Fève (VFA) d'autre part, quoique présentant la même spécificité envers le mannose ou le glucose, reconnaissent des séquences oligosaccharidiques différentes. Le fucose lié en $(\alpha 1-6)$ sur la N-acétylglucosamine impliquée dans la liaison N-glycosidique est l'un des déterminants majeurs de la reconnaissance des glycanes de type N-acétyllactosaminique par ces dernières lectines, alors que sa présence n'est pas indispensable lors de la reconnaissance de ces mêmes glycanes par la Concanavaline A.

3/ Des lectines différentes reconnaissent des séquences oligosaccharidiques différentes, mais pouvant appartenir à une même glycoprotéine. Comme ces séquences sont communes à de nombreuses glycoprotéines, y compris les glycoprotéines membranaires, l'utilisation des lectines et l'interprétation des résultats obtenus doivent être effectuées avec prudence.

4/ Nos résultats confirment certaines données précédemment obtenues sur la configuration spatiale des glycannes des glycoprotéines (voir p.33). En effet, différentes lectines (RCA_{I} , RCA_{II} , LCA, VFA) présentent une plus grande affinité pour des séquences saccharidiques substituées par un résidu d'acide sialique en ($\alpha 2-6$) plutôt qu'en ($\alpha 2-3$). Ce résultat confirme que les acides sialiques liés en position ($\alpha 2-6$) sont plus mobiles dans l'espace que ceux liés en ($\alpha 2-3$).

De même, la séquence GlcNAc($\beta 1$ -)Asn confère plus de rigidité aux glycopeptides par rapport aux oligosaccharides qui en sont dépourvus. Ce résultat explique la plus forte affinité de lectines comme la LCA, la VFA ou la PSA pour des glycoprotéines natives ou pour des glycopeptides par rapport aux oligosaccharides qui en dérivent.

Enfin, la plus grande flexibilité dans l'espace des séquences oligosaccharidiques autour d'une liaison (1-6) par rapport à une plus grande rigidité imposée par la liaison (1-3) permet d'expliquer la grande affinité de la lectine de Lentille pour des N-glycosylpeptides triantennés et fucosylés en ($\alpha 1-6$) sur l'osamine du point d'attache, à condition que la troisième antenne substitue en ($\beta 1-6$) le résidu d' α -mannose lié en ($\alpha 1-6$) du noyau pentasaccharidique.

5/ Pour certaines lectines, un effet d'avidité (MONSIGNY et al. [291]) est nécessaire pour que l'interaction du glycopeptide ou de l'oligosaccharide avec les lectines ait lieu. C'est, par exemple, le cas pour la lectine du germe de Blé (WGA) qui n'interagit qu'avec certains glycopeptides ou oligosaccharides possédant un grand nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique ou de N-acétylglucosamine. C'est le même effet qui permet d'expliquer la plus ou moins grande affinité d'une lectine pour des glycoprotéines possédant des groupements glycaniques reconnus par la lectine, mais en nombre plus ou moins important.

B - Spécificité des lectines immobilisées.

Une autre méthode permettant de préciser la spécificité d'une lectine envers des structures glycaniques complexes consiste, après avoir immobilisé la lectine sur un support, à déterminer la capacité

de cette lectine à reconnaître et à fixer des structures glycaniques bien précises.

Cette approche expérimentale nécessite beaucoup moins de glycopeptides ou d'oligosaccharides de structure connue que la technique précédemment décrite d'inhibition de l'hémagglutination. En effet, les glycopeptides peuvent être N-[¹⁴C]-acétylés par réaction avec de l'anhydride acétique [¹⁴C] et les oligosaccharides tritiés par réduction à l'aide de borohydrure de potassium tritié.

Les quantités de structures glycaniques utilisées pour un étalonnage sont comprises entre 0,1 et 10 nmoles.

D'autre part, les résultats obtenus grâce à cette technique d'étalonnage sont directement superposables à ceux obtenus par fractionnement sur la même lectine immobilisée de mélanges complexes de structures glycaniques d'origines diverses. Après un étalonnage rigoureux de ces colonnes de lectines immobilisées, on peut ainsi déduire, d'après leur comportement sur ces colonnes, les structures glycaniques approximatives de certaines fractions oligosaccharidiques ou glycopeptidiques.

Enfin, la spécificité des lectines immobilisées peut parfois être précisée en déterminant par des méthodes conventionnelles (méthanololyse, méthylation, ¹H-RMN), la ou les structures glycaniques d'oligosaccharides ou de glycopeptides ayant interagi avec la lectine immobilisée lors d'un fractionnement.

Les résultats présentés dans les publications N°14 et N°15 (p. 309) nous ont ainsi apporté de précieux renseignements complémentaires quant aux spécificités de la Concanavaleine A et de la lectine de lentille immobilisées.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les cinq mémoires suivants (Publications N°3, 4, 5, 6 et 7).

* * *

PUBLICATION N°3

STRUCTURAL BASIS FOR THE AFFINITY OF FOUR INSOLUBILIZED LECTINS, WITH
A SPECIFICITY FOR α -D-MANNOSE, TOWARDS VARIOUS GLYCOPEPTIDES WITH THE
N-GLYCOSYLAMINE LINKAGE AND RELATED OLIGOSACCHARIDES.

In : "LECTINS-BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY", CLINICAL BIOCHEMISTRY, ed.
T.C. BØG-HANSEN, DE GRUYTER, BERLIN, 1981, VOL. 1, P.221-230.

* * *

Offprint from
Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol. I
edited by T. C. Bøg-Hansen
© Walter de Gruyter · Berlin · New York 1981 - Printed in Germany

STRUCTURAL BASIS FOR THE AFFINITY OF FOUR INSOLUBILIZED LECTINS, WITH A SPECIFICITY FOR α -D-MANNOSE, TOWARDS VARIOUS GLYCOPEPTIDES WITH THE N-GLYCOSYLAMINE LINKAGE AND RELATED OLIGOSACCHARIDES

H. Debray and J. Montreuil

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé du CNRS n° 217, BP 36, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex and Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, U. 124 INSERM (Pr. G. Biserte), BP 311, 59020 Lille Cédex, France

Introduction

Lectins are now widely used as tools to visualize the topography of saccharide moieties on cell surfaces (1), or to follow by lectin-affinity immunoelectrophoresis (2) variations in the glycosylation of plasma (3) or membrane glycoproteins (4). Insolubilized on various supports, lectins are also widely used to fractionate soluble or membrane glycoproteins of diverse origins (5) as well as glycopeptides obtained from soluble or membrane-bound glycoproteins (6).

Among the most used lectins are the so-called α -D-Mannose or Glucose binding lectins : Concanavalin A (Con A), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Vicia faba* agglutinin (VFA) and *Pisum sativum* agglutinin (PSA) (7). However, it is now well known that it is not only a monosaccharide residue in a terminal non reducing position on a glycan that is recognized by a given lectin, but more complex saccharidic sequences (8).

In previous studies (9, 10), we used oligosaccharides or glycopeptides related to glycoproteins with the N-glycosylamine linkage (11) to precise the specificities of various lectins and

in particular of the above α -D-Mannose binding lectins, by inhibition of agglutination of human red blood cells. These results were completed by studying the affinity of the insolubilized lectins towards these oligosaccharides or glycopeptides.

Materials and Methods

Lectins. All the lectins used in this study, except Concanavalin A which was purchased from Pharmindustrie, Clichy, France, have been purified by affinity chromatography.

Origin of glycopeptides and oligosaccharides. Oligosaccharides (N-9, N-5, N-6, S-6a) shown in fig. 1 were isolated by Dr. G. Strecker from the urines of patients with various lysosomal diseases (12). Glycopeptides isolated from human serotransferrin (GP-h-STF), from human lactotransferrin (GP-h-LTF₁) and from hen ovotransferrin (GP-ovotTF) were a gift from Dr. G. Spik. The glycopeptide of the oligomannosidic type, isolated from bovine lactotransferrin (GP-b-LTF) was a gift from Dr. A. Chéron.

All these structures shown in fig. 1 are related to glycoproteins with the N-glycosidic linkage and belong to 2 types of glycan structures shown in fig. 2 : the N-acetyllactosaminic and the oligomannosidic type (11).

Hemagglutination tests. Agglutination of human red blood cells group O⁺ and hemagglutination inhibition by various oligosaccharides or glycopeptides were carried out according to Matsumoto and Osawa (13).

Results were expressed as the minimum concentration of sugar (mM) necessary to completely inhibit agglutination.

Insolubilization of lectins on Sepharose 4B. Lectins were coupled to Sepharose 4B activated according to the procedure of March *et al.* (14), at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel.

	GP-hLTF-1	GP-hSTF	Asialo-GP-STF	Asialo-galacto-GP-STF	GP-ovoTF	GP-hLTF
Con A	0.103	0.103	0.103	0.062	0.207	0.0062
LCA	0.0015	0.0125	> 3.33	> 3.33	1.66	0.207
VFA	0.0031	0.0515	> 3.33	> 3.33	0.207	0.83
PSA	0.0031	0.0515	> 3.33	> 3.33	N.D.	0.415

	N-9	N-5	Asialo-N-9	N-6	S-6a
Con A	0.103	0.103	0.0515	0.025	0.0012
LCA	1.66	0.35	0.415	0.103	0.63
VFA	0.415	0.175	0.207	0.103	1.24
PSA	1.66	N.D.	1.66	N.D.	N.D.

Fig. 1.- Saccharidic determinants recognized by Con A, LCA, VFA and PSA on glycans from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage.

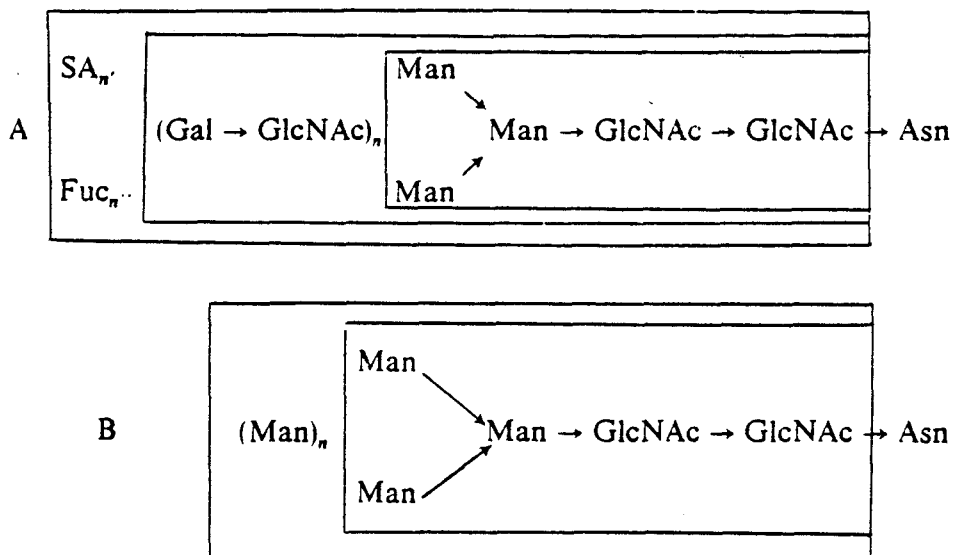


Fig. 2. General structural scheme of glycans from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage. A) N-acetyllactosaminic type. B) Oligomannosidic type (according to Montreuil) (11).

Affinity chromatography of oligosaccharides or glycopeptides on lectin-Sepharose column. Glycopeptides, N-¹⁴C acetylated according to Koide *et al.* (15), or related oligosaccharides, reduced on the terminal N-acetylglucosamine residue with tritiated sodium borohydride (16) were applied, after dissolution in phosphate buffered saline pH 7.4 (LCA, VFA, PSA) or in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.2 containing 0.1 M NaCl and CaCl₂, MgCl₂ (1 mM each) in the case of insolubilized Con A, to the column of lectin-Sepharose (10 x 1 cm) equilibrated with the same buffer. Elution was carried out first with buffer and then with buffer containing 0.15 M methyl- α -D-glucoside.

Fractions of 2 ml were collected and samples of 100 μ l analysed for radioactivity.

Results and Discussion

Hemagglutination Inhibition Results

These results are summarized in fig. 1. The best inhibitors found for Con A are asialo-agalacto GP-h-STF and the related oligosaccharide S-6a and Con A presents a great affinity for the trimannosidic core substituted by two N-acetylglucosaminy residues. It is noteworthy that this affinity, as measured by inhibition of agglutination, is not decreased by the addition of a β -1,4-linked N-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue.

On the other hand, Con A also presents a great affinity for GP-b-LTF which possesses the complete trimannosidic core with α -1,3 and α -1,6-Mannose substituted by four additional α -linked Mannose residues (oligomannosidic structure). Substitution of core α -1,3-Mannose at position C-4, as in GP-ovoTF, decreases the affinity of Con A.

However, the best inhibitor found for the three others lectins LCA, VFA and PSA is glycopeptide GP-h-LTF₁ and α -1,6-linked Fucose seems to be a major determinant of the binding, for its removal with an α -L-Fucosidase from rat kidney gives glycopeptides 10-fold less inhibitory (GP-h-STF). However, if presence of an α -1,6-linked Fucose near the N-glycosidic linkage seems to be a necessary condition, its presence is not a sufficient one and glycopeptides possessing this fucose residue, but where terminal neuraminylactosamine sequences are lacking are very poor inhibitors (10). This suggests the existence of an extended carbohydrate binding site for LCA, VFA and PSA and the methyl group of L-Fucose near the N-glycosidic linkage could interact with an hydrophobic area in or near this carbohydrate binding site. This hydrophobic area had been previously suggested for LCA, VFA and PSA by Allen *et al.* (17). Such an hydrophobic region, close to the carbohydrate-binding site had also been demonstrated for Con A (18).

Affinity Chromatography of Glycopeptides with the N-Glycosylamine Linkage and Related Oligosaccharides on Insolubilized Lectins

The hemagglutination inhibition values given in fig. 1 can be compared to the true association constants between various oligosaccharides or glycopeptides and a given lectin and from these inhibition values, the affinity of a saccharide for the insolubilized lectin could be predicted.

In fact, for insolubilized Con A, results obtained by this second method, confirms previous data (19, 23). The four elution profiles which can be obtained with insolubilized Con A are shown in fig. 3 :

- The non-retained profile (FNR) is obtained with tetra- or triantennary glycopeptides of the N-acetyllactosaminic type or with biantennary structures possessing an additional β -1,4-linked N-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue. One can note that this last point is in contrast with the hemagglutination inhibition result where this β -1,4 substituted glycan possesses the same inhibitory power than the unsubstituted one (S-6a). This discrepancy is not explained.

- The retarded profile (FR) is obtained by elution with the starting buffer and reflects a weak affinity between Con A and the saccharide. This profile is obtained with biantennary structures as GP-h-STF (21, 22). However, with a higher concentration of Con A in the gel, these structures can be weakly retained and then eluted specifically with low concentration of α -methyl-D-glucoside or mannoside (20).

- The sharp elution profile (FE) with 0.15 M α -methyl-D-glucoside is obtained with oligomannosidic type glycans as GP-h-LTF (21, 22). However, with a higher concentration of Con A in the gel, a broad peak can be obtained (20) and some glycans cannot be eluted with α -methyl-D-mannoside but only with detergents (19).

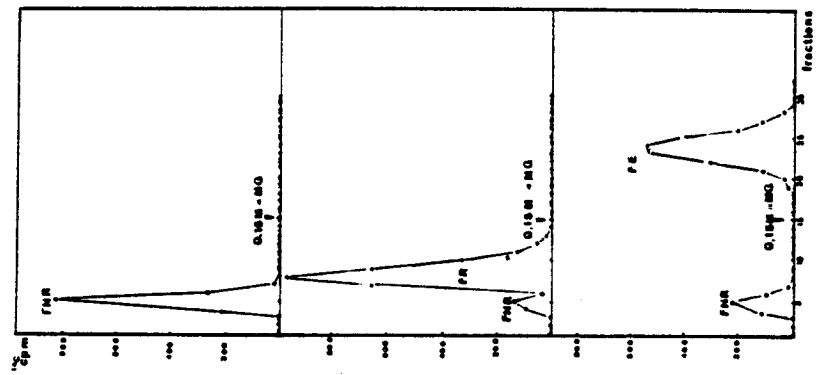


Fig. 4.- LCA, VFA or PSA-Sepharose elution profiles.

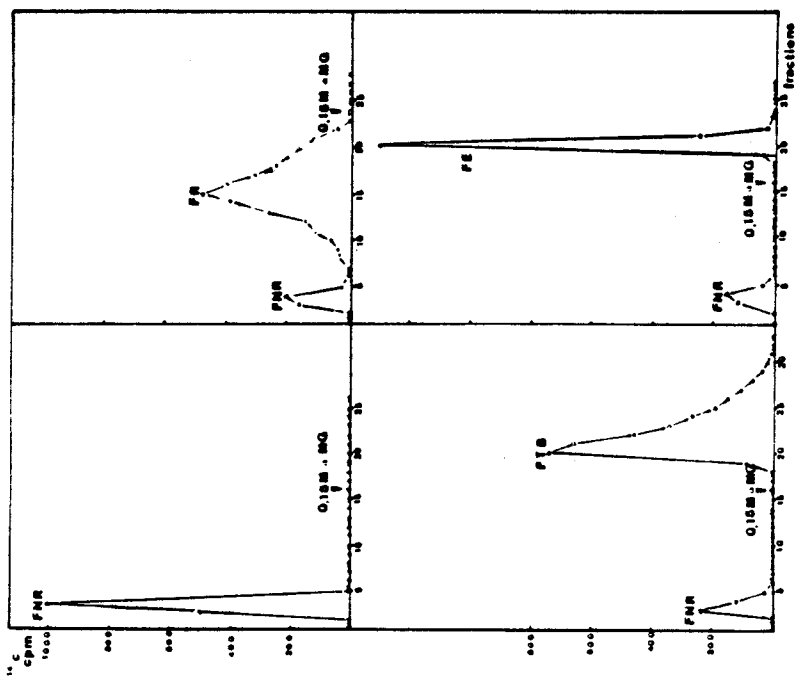


Fig. 3.- Con A-Sepharose elution profiles.

- The "tightly bound" profile (FTB) is obtained with biantennary structures such as S-6a or asialo-agalacto-GP-h-STF, where at least one N-acetylglucosamine $\beta(1 \rightarrow 2)$ α -Mannose sequence is very accessible to the lectin. Same results were described by Narasimhan *et al.* (22) and Baenziger and Fiete (23) and this broad, trailing profile expresses a very great affinity between the saccharide and the lectin.

With insolubilized LCA, VFA or PSA, three elution profiles shown in fig. 4 can be obtained :

- The non-retained profile (FNR) is obtained with tetra- or biantennary glycopeptides lacking the α -1,6-linked Fucose on the N-acetylglucosamine involved in the N-glycosylamine bond.

- The retarded profile (FR) is obtained for insolubilized VFA or PSA, with biantennary glycopeptides (GP-h-LTF) possessing this α -1,6-linked Fucose.

- This glycopeptide (GP-h-LTF) is tightly bound (FE) on insolubilized LCA and is only displaced with 0.15 M α -methyl-D-glucoside.

However, if the presence of this α -1,6 linked Fucose seems to be a necessary condition for the recognition by LCA or PSA and VFA, its presence is not a sufficient one, for the glycan, liberated from glycopeptide GP-h-LTF by hydrazinolysis and which still possesses this α -1,6-linked Fucose, is no longer retarded on VFA and PSA or retained on insolubilized LCA.

These interactions between glycopeptides such as GP-h-LTF and LCA can also involve charge effects and (or) some hydrophobic interactions between an hydrophobic area in or near the carbohydrate binding site of the lectin and aromatic residues of the peptidic part of the glycopeptides or glycoproteins.

Conclusion

Our results show that four lectins (Con A, LCA, VFA and PSA), considered to be identical in terms of α -D-Mannose or Glucose specificity, possess the ability to recognize fine differences in more complex carbohydrate structures.

While insolubilized Con A represents a very useful tool for the fractionation of both N-acetyllactosaminic and oligomannosidic type glycopeptides or related oligosaccharides, the three others lectins will also be very useful for the separation of N-acetyllactosaminic type glycopeptides on the condition that an α -L-Fucose residue substitutes in C-6 the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (L.A. n° 217), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124) and by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Grant n° 79.7.0669).

References

1. Virtanen, I., Letho, V.P. : These proceedings.
2. Bøgg-Hansen, T.C., Bjerrum, O.J., Ramlau, J. : Scand. J. Immunol. 4, suppl. 2, 141-147 (1975).
3. Kerckaert, J.P., Bayard, B. : These proceedings.
4. Bjerrum, O.J., Bøgg-Hansen, T.C. : Biochim. Biophys. Acta 455, 66-89 (1976).
5. Lotan, R., Nicolson, G.L. : Biochim. Biophys. Acta 559, 329-376 (1979).
6. Finne, J., Krusius, T., Järnefelt, J., 27th International Congress of Pure and Applied Chemistry (ed. A. Varmavuori) Pergamon Press, Oxford-New York, pp. 147-159, 1980.

7. Goldstein, I.J., Hayes, C.E. : Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 35, 127-340 (1978).
8. Kornfeld, R., Ferris, C. : J. Biol. Chem. 250, 2614-2619 (1975).
9. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Montreuil, J., Monsigny, M. : Protides of Biological Fluids, 27th Colloquium, Brussels (ed. H. Peeters), pp. 451-454, Pergamon Press, Oxford, 1979.
10. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J. : Eur. J. Biochem. (submitted for publication).
11. Montreuil, J. : Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 37, 157-223 (1980).
12. Strecker, G., Montreuil, J. : Biochimie 61, 1199-1246 (1979).
13. Matsumoto, I., Osawa, T. : Arch. Biochem. Biophys. 140, 484-491 (1970).
14. March, S.C., Parikh, I., Cuatrecasas, P. : Anal. Biochem. 60, 149-152 (1974).
15. Koide, N., Muramatsu, T. : J. Biol. Chem. 249, 4897-4904 (1974).
16. Takasaki, S., Kobata, A. : J. Biochem.(Tokyo) 76, 783-789 (1974).
17. Allen, A.K., Desai, N.N., Neuberger, A. : Biochem. J. 155 127-135 (1976).
18. Loontjens, F.G., Van Wauwe, J.P., De Gussem, R., De Bruyne, C.K. : Carbohyd. Res. 30, 51-62 (1973).
19. Ogata, S., Muramatsu, T., Kobata, A. : J. Biochem. 78, 687-696 (1975).
20. Krusius, T., Finne, J., Rauvala, H. : FEBS-Lett. 71, 117-120 (1976).
21. Debray, H., Montreuil, J. : Biochimie 60, 697-704 (1978).
22. Narasimhan, S., Wilson, J.R., Martin, E., Schachter, H. : Can. J. Biochem. 57, 83-96 (1979).
23. Baenziger, J.U., Fiete, D. : J. Biol. Chem. 254, 2400-2407 (1979).

*
* *

PUBLICATION N°4

AFFINITY OF TEN INSOLUBILIZED LECTINS TOWARDS VARIOUS GLYCOPEPTIDES
WITH THE N-GLYCOSYLAMINE LINKAGE AND RELATED OLIGOSACCHARIDES.
In : "LECTINS-BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY", CLINICAL BIOCHEMISTRY, ed.
T.C. BØG-HANSEN AND G.A. SPENGLER, DE GRUYTER, BERLIN, 1983, VOL. 3,
P.335-350.

*
* *

Reprint from:
Lectins, Vol. III
Editors: T. C. Bøg-Hansen, G. A. Spengler
© Walter de Gruyter & Co. 1983, Berlin · New York - Printed in Germany

AFFINITY OF TEN INSOLUBILIZED LECTINS TOWARDS VARIOUS GLYCOPEPTIDES WITH THE N-GLYCOSYLAMINE LINKAGE AND RELATED OLIGOSACCHARIDES

H. Debray, A. Pierce-Crétel, G. Spik and J. MONTREUIL
Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I et Laboratoire Associé au CNRS n° 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Insolubilized on various supports, lectins are now widely used to fractionate soluble or membrane glycoproteins of diverse origins (1) as well as glycopeptides obtained from soluble or membrane-bound glycoproteins (2, 3).

For some lectins and in particular for Con A, the structural basis for the interaction of glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides is now well defined (4, 6), but for other lectins, these structural requirements are still poorly understood.

In a previous study (7), we used oligosaccharides or glycopeptides related to glycoproteins with the N-glycosylamine linkage (8) to precise the specificities of various lectins, by inhibition of agglutination of human red blood cells. These results are here completed by studying the affinity of the insolubilized lectins towards these oligosaccharides or glycopeptides.

Materials and Methods

Lectins. - All the lectins used in this study (*Lens culinaris* agglutinin : LCA, *Vicia faba* agglutinin : VFA, *Pisum sativum* agglutinin : PSA, *Ricinus communis* agglutinins I and II : RCA_I

and RCA_{II}, wheat germ agglutinin : WGA, *Lotus tetragonolobus* agglutinin : LTA, *Ulex europeus* agglutinin I : UEA_I, except Concanavalin A which was purchased from Pharmindustrie, Clichy, France, have been purified by affinity chromatography as described (7). *Griffonia simplicifolia* agglutinin II : GSA_{II} was purified from seeds of *Griffonia simplicifolia* on a Sepharose-ovomucoid column (unpublished results).

Insolubilization of lectins on Sepharose 4B.- Lectins were coupled to Sepharose 4B activated according to the procedure of March *et al.* (9), at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel.

Origin of glycopeptides and oligosaccharides.- Oligosaccharides, native or after digestion with various exoglycosidases (Structures 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 25, 27, 28, 34, 35, 36, 38 shown in fig. 1 to 4) were isolated by Dr. G. Strecker from the urines of patients with various lysosomal diseases (10). Glycopeptides, native or after digestion with various exoglycosidases, isolated from human serotransferrin (Structures 1, 7, 19), from human lactotransferrin (Structures 5, 6, 10, 22), from hen ovotransferrin (Structure 33), from bovine lactotransferrin (Structure 37), from Cohn's fraction IV (Structure 29) and from human milk IgA (Structures 15, 16, 17, 18) were gifts from Dr. G. Spik. Glycopeptides 26 and 27, isolated from human α_1 -acid glycoprotein, were obtained from Dr. B. Fournet. Glycopeptide 30 was isolated from calf fetuin and the hybrid type glycopeptide (Structure 39) isolated from hen ovalbumin was a gift from Dr. A. Kobata. All these structures are related to glycoproteins with the N-glycosidic linkage (8).

Affinity chromatography of oligosaccharides or glycopeptides on lectin-Sepharose column.- Glycopeptides, N-[¹⁴C]acetylated according to Koide *et al.* (11) or related oligosaccharides, reduced at the terminal N-acetylglucosamine residue with tritia-

ted sodium borohydride, were applied on the columns of lectin-Sepharose (10 x 1 cm) equilibrated in phosphate buffered saline pH 7.4 or in 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.2 containing 0.1 M NaCl and CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 (1 mM each) in the case of insolubilized Con A. Elution was carried out first with the above buffers and then with buffer containing 0.01 M or 0.3 M α -methyl glucoside in the case of Con A-Sepharose or 0.15 M sugar for the other insolubilized lectins.

Results and Discussion

Four elution profiles can be obtained with insolubilized lectins as previously described (6) :

- i) The non-retained profile (FNR) reflects a lack of interaction between the lectin and the saccharide.
- ii) The retarded profile (FR) is obtained by elution with the starting buffer and reflects a weak affinity between the lectin and the saccharide. The elution volume can be more or less important (FR^- , FR^+ , FR^{++}).
- iii) The sharp elution profile (FE), obtained with the starting buffer containing the competing sugar, reflects a higher affinity between the lectin and the saccharide.
- iv) The "tightly bound" profile is obtained also with the starting buffer containing the competing sugar. This broad, trailing peak expresses a very great affinity between the saccharide and the lectin.

Lectins with a specificity for α -D-mannose or α -D-glucose.-
The results obtained with four lectins (Con A, LCA, VFA and PSA), considered to be identical in terms of α -D-mannose or α -D-glucose specificity were previously reported (6) and are

	GLYCAN STRUCTURE	Con A	LCA	VFA	PSA	RCA _I	RCA _{II}	GSA _{II}	WGA	UEA _I	LTA
1	α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-Asn	FE 10mM α MG	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FR ⁺	FNR	FNR	FNR	FNR
2	α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)-GlcNAc	FE 10mM α MG	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FNR	FNR	FNR	FNR
3	α -NeuAc-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) α -NeuAc-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)-GlcNAc	ND	ND	ND	ND	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR
4	α -NeuAc-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)-GlcNAc	ND	ND	ND	ND	FNR	FR ⁻	FNR	FNR	FNR	FNR
5	α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-Asn α -Fuc (1,6)	FE 10mM α MG	FE	FE	FE	FR ⁻	FR ⁺	FNR	FNR	FNR	FNR
6	α -NeuAc-(2-6)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-Asn α -Fuc (1,3) and (1,6)	FE 10mM α MG	FE	FE	FE	FR	FE	FNR	FNR	FNR	FNR
7	β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-Asn	FE 10mM MG	FNR	FNR	FNR	FR	FR ⁺	FNR	FNR	FNR	FNR
8	β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)-GlcNAc	FE 10mM α MG	FNR	FNR	FNR	FR	FE	FNR	FNR	FNR	FNR
9	β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -GlcNAc-(1-4)- β -Man-(1-4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FNR	FNR	FNR	FNR
10	β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-Asn α -Fuc (1,6)	FE 10mM α MG	FE	FE	FE	FR	FE	FNR	FNR	FNR	FNR
11	α -NeuAc-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-3) β -Gal-(1-4)- β -GlcNAc-(1-2)- α -Man-(1-6) β -Man-(1-4)-GlcNAc	FE 10mM α MG	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR

Fig. 1.- Interaction of insolubilized lectins with glycans from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage.

	GLYCAN STRUCTURE	Con A	LCA	VFA	PSA	RCA _I	RCA _{II}	GSA _{II}	WGA	UEA _I	LTA
12	α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	FE 10mM 4MG	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR
13	α -NeuAc-(2 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)- β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	ND	ND	ND	ND	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR
14	α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)- β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	ND	ND	ND	ND	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR
15	β -Gal-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn	FE 10mM 4MG	FNR	FNR	FNR	FR	FE	FNR	FR ⁻	FNR	FNR
16	β -Gal-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn	FE 10mM 4MG	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FR	FNR	FR	FNR	FNR
17	β -Gal-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn α -Fuc (1,6)	FE 10mM 4MG	FE	FE	FE	FR	FE	FNR	FR ⁻	FNR	FNR
18	β -Gal-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn α -Fuc (1,6)	FE 10mM 4MG	FE	FE	FE	FR ⁻	FR	FNR	FNR	FNR	FNR
19	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn	FTB	FR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR	FR ⁻	FNR	FNR
20	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	FTB	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR	FNR	FNR	FNR
21	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)	FR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FNR	FNR	FNR
22	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn α -Fuc (1,6)	FTB	FTB	FTB	FTB	FNR	FNR	FR	FNR	FNR	FNR
23	α -Man-(1 \rightarrow 6)- β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn α -Fuc (1,6)	FR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR

Fig. 2.- Interaction of insolubilized lectins with glycans from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage.

here extended. For Con A, bi-antennary structures of the N-acetyllactosaminic type possessing an additional β -(1 + 4)-linked N-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue can be either retarded (Structure 21) or weakly retained (Structures 16 and 18) on the condition that at least one β -GlcNAc-(1 + 2)-mannose sequence is unmasked on the oligosaccharide or on the glycopeptide.

Moreover, in the case of this oligosaccharide and these glycopeptides, Con A-Sepharose possesses a higher affinity for the glycopeptides than for the related oligosaccharides, which could be explained by the fact that the glycan-amino acid linkage leads to structures more rigid than those of the corresponding oligosaccharide.

The affinity for Con A-Sepharose towards an hybrid type glycopeptide from hen ovalbumin (Structure 39) is also interesting : the insolubilized Con A possesses a relatively weak affinity for this structure which can be eluted from the column with 10 mM α -methyl glucoside, but it must be noted that the elution volume is larger than that obtained with bi-antennary N-acetyllactosaminic type glycopeptide (Structure 1) which is also eluted with 10 mM α MG. However, the affinity of Con A-Sepharose is weaker for this hybrid-type glycopeptide than for an oligomannosidic type glycopeptide (Structure 37) which is eluted from the column with 0.3 M α -methyl glucoside. The same hybrid-type glycopeptide is not retained on LCA, VFA or PSA-Sepharose columns.

As previously reported (6, 7), these three insolubilized lectins recognize the pentasaccharidic core substituted by two β -(1 + 2)-N-acetylglucosamine residues and possessing an α -L-fucose residue at the C-6 position on the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond.

These results on the specificities of LCA and PSA were recently confirmed and extended by Kornfeld *et al.* (12), who have

shown that LCA or PSA can also interact with tri-antennary glycopeptides possessing an α -L-fucose residue substituting in C-6 position the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine linkage, but an important condition for this interaction to take place is that this third branch substitutes a core α -mannose residue in the C-6 position. If this substitution is at the C-4 position, LCA or PSA do not have any affinity for these new tri-antennary structures.

Our results show also that, in contrast to Con A, LCA, VFA or PSA can interact with bi-antennary structures possessing an additional β -(1 \rightarrow 4)-linked N-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue, but on the condition that these structures possess an α -L-fucose residue in C-6 position on the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond (Structure 18).

Lectins with a specificity for galactose.- *Ricinus communis* agglutinins (RCA_I et RCA_{II}) are very useful for the fractionation of N-acetyllactosaminic type glycopeptides or oligosaccharides. The affinity between the lectins and the saccharide increases with the number of N-acetyllactosamine sequences present in the carbohydrate structure (Structure 7 compared to Structure 31). Substitution of these N-acetyllactosamine sequences by sialic acid residues at the C-6 position of galactose decreases the affinity of the lectins for the saccharide (Structure 5 compared to Structure 10). Moreover, substitution of the β -mannose residue by an additional β -(1 \rightarrow 4)-N-acetylglucosamine residue decreases the affinity of the lectins for these structures as compared to the unsubstituted ones (Structure 9 compared to structure 8).

Lectins with a specificity for N-acetylglucosamine

wheat germ agglutinin.- Our results agree with those previously published by Yamamoto *et al.* (13) and show that insolubilized WGA presents a stronger affinity for hybrid-type

	GLYCAN STRUCTURE	ConA	LCA	VFA	PSA	RCA _I	RCA _{II}	GSA _{II}	WGA	UEA _I	LTA
33	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn α -Fuc	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁺	FNR	FNR	FNR
34	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁻	FNR	FNR	FNR
35	β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR	FR	FE	FNR	FNR	FNR	FNR
36	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FE	FNR	FNR	FNR
37	α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) α -Man-(1 \rightarrow 3)- α -Man-(1 \rightarrow 6) α -Man β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn 1,6	FE 0.3M < MG	FR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR
38	β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FR ⁺⁺	FNR	FNR	FNR
39	β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3) β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6) α -Man-(1 \rightarrow 6)- α -Man-(1 \rightarrow 6) α -Man-(1 \rightarrow 3) β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Asn	FE 10mM < MG	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FNR	FE	FNR	FNR

Fig. 4.- Interaction of insolubilized lectins with glycans from glycoproteins with the N-glycosylamine linkage.

glycopeptides such as those found in hen ovalbumin (Structure 39). Structure 16 which possesses also a β -N-acetylglucosamine residue linked to C-4 of the β -linked mannose residue but belongs to the N-acetyllactosaminic type family, presents a weaker affinity for WGA, and structure 18 which just differs from structure 16 by the presence of an α -L-fucose residue in C-6 position on the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond is no more recognized by insolubilized WGA. The lectin does not present any affinity for oligomannosidic-type glycopeptides (Structure 37). As found also by Yamamoto *et al.* (13), the N-N'-diacetylchitobiose moiety has to be intact, for, oligosaccharide 21 which possesses the β -N-acetylglucosamine residue in C-4 position on the β -mannose residue, but where the β -GlcNAc-(1 +)-Asn sequence is lacking is not retained on WGA-Sepharose. It can also be noted that sialylated glycopeptides (Structures 1, 29, 30) or sialylated oligosaccharides (Structure 2) are not recognized by insolubilized WGA. These interactions involve a charge effect and depend on a mechanism called by Monsigny *et al.* (14) "avidity effect" : only glycopeptides with a high density of terminal non-reducing N-acetylglucosamine or N-acetylneuraminic acid residues interact with WGA.

Griffonia simplicifolia agglutinin.- This insolubilized lectin represents a very useful tool for the fractionation of glycopeptides or oligosaccharides with unmasked N-acetylglucosamine residues in a terminal non-reducing position and the affinity of the lectin increases with the number of such residues : glycopeptide 19 is more retarded on the column than glycopeptide 33. But, at least two of such N-acetylglucosamine residues are necessary for the interaction to take place, for glycopeptides 15, 16, 17, 18 or 39 with only one unmasked N-acetylglucosamine residue are not retained on the column. In the case of structures with two terminal non-reducing N-acetylglucosamine, GSA_{II} presents a greater affinity for the glycopeptide than for the related oligosaccharide (Glycopeptide 19

compared to oligosaccharide 20 or 21). This can also be explained by the fact that the glycan-amino acid linkage leads to structures more rigid than those of the oligosaccharides.

Lectins with a specificity for L-fucose.- *Lotus tetragonolobus* agglutinin or *Ulex europaeus* agglutinin I have no affinity for glycopeptides or oligosaccharides of the N-acetyllactosaminic type, even if these structures possess one or two fucose residues α -(1 + 3) or α -(1 + 6)-linked to N-acetylglucosamine residues as in glycopeptide 5 or 6.

As previously described by Pereira *et al.* (15), the specificity of these two lectins seems to be directly towards the α -(1 + 2)-linked fucose residues found in blood-group H active substances.

Conclusions

This work completes and extends our previous results obtained by inhibition of the agglutination of human-red blood cells induced by lectins (7). These results confirm that lectins, considered "identical" in terms of monosaccharide specificity, possess the ability to recognize fine differences in more complex structures and this can be used to fractionate mixtures of N-glycopeptides of various origins.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé n° 217) and by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Grant 79-7-0669). We thank Drs G. Strecker, B. Fournet and A. Kobata for their generous gifts of oligosaccharides and glycopeptides.

References

1. Lotan, R., Nicolson, G.L. : *Biochim. Biophys. Acta* 559, 329-376 (1979).
2. Finne, J., Krusius, T., Järnefelt, J. : 27th International Congress of Pure and Applied Chemistry (ed. A. Varmavuori) Pergamon Press, Oxford-New York, pp. 147-159, 1980.
3. Dall'Olio, F., Serafini-Cessi, F., Scannavini, M., Campadelli-Fiume, G. : These proceedings.
4. Ogata, S., Muramatsu, T., Kobata, A. : *J. Biochem.* 78, 687-696 (1975).
5. Krusius, T., Finne, J., Rauvala, H. : *FEBS-Letters* 71, 117-120 (1976).
6. Debray, H., Montreuil, J. : *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol. 1, pp. 221-230, Walter de Gruyter, Berlin-New York (1981).
7. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J. : *Eur. J. Biochem.* 117, 41-55 (1981).
8. Montreuil, J. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37, 157-223 (1980).
9. March, S.C., Parikh, I., Cuatrecasas, P. : *Anal. Biochem.* 60, 149-152 (1974).
10. Strecker, G., Montreuil, J. : *Biochimie* 61, 1199-1246 (1979).
11. Koide, N., Muramatsu, T. : *J. Biol. Chem.* 249, 4897-4904 (1974).
12. Kornfeld, K., Reitman, M.L., Kornfeld, R. : *J. Biol. Chem.* 256, 6633-6640 (1981).
13. Yamamoto, K., Tsuji, T., Matsumoto, I., Osawa, T. : *Biochemistry* 20, 5894-5899 (1981).
14. Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R., Delmotte, F. : *Eur. J. Biochem.* 104, 147-153 (1980).
15. Pereira, M.E.A., Kisailus, E.C., Gruezo, F., Kabat, E.A. : *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 108-115 (1978).

* * *

PUBLICATION N°5

NEW INFORMATIONS ON THE FINE SPECIFICITY OF IMMOBILIZED CONCAVALIN A
AND LENS CULINARIS AGGLUTININ TOWARD N-GLYCOSYLPEPTIDES.

FEBS LETT. (1987) (SUBMITTED FOR PUBLICATION)

* * *

Immobilized on various supports, lectins are now widely used to fractionate soluble or membrane glycoproteins of diverse origins (1) as well as glycopeptides obtained from soluble or membrane bound glycoproteins (2,4).

For some lectins, in particular for Con A, the structural basis for the interaction of glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides is now well defined (5-9), but for some other lectins, these structural requirements are still poorly understood.

In previous study (10), we used oligosaccharides and glycopeptides related to glycoproteins with the N-glycosylamine linkage (11) to define the specificity of twelve lectins by inhibition of agglutination of human red blood cells. This work has been completed by studying the affinity of the immobilized lectins towards these oligosaccharides or glycopeptides (9,12). A serial affinity chromatography on immobilized con A and *Lens culinaris* agglutinin was proposed by CUMMINGS et al (13). Such a procedure is here largely improved by an extensive calibration of the affinity columns with N-glycosylpeptides of known structures and new data concerning the fine specificities of the two lectins are provided.

MATERIALS AND METHODS

Materials

[1-¹⁴C] acetic anhydrid (7 mCi/mM) was from the Commissariat à l'Energie Atomique, France ; Methyl- α -D-glucopyranoside from Sigma, USA and Aqualyte liquid scintillation cocktail from J.T. Baker chemicals, Holland.

Immobilized lectins

Concanavalin A-Sepharose 4B was obtained from Pharmacia France. *Lens culinaris* agglutinin (PSA), *Vicia faba* agglutinin (VFA) and *Pisum sativum* agglutinin (PSA) have been purified by affinity chromatography as earlier described (10). These lectins were coupled to Sepharose 4B activated according to the procedure of MARCH *et al.* (14), at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel.

Origin of glycopeptides

Glycopeptides used in this study and listed in figure 1 were isolated from human serotransferrin (Structure 1), from human lactotransferrin (Structure 2 and 3), from bovine lactotransferrin (Structure 4) and from human milk sIgA (Structures 5 to 8) and were gifts from Pr. G. SPIK. Glycopeptide 9, isolated from human α_1 -acid glycoprotein, was obtained from Pr. B. FOURNET. Glycopeptide 10 was isolated from calf fetuin and glycopeptide 11 from porcine thyroglobulin. Glycopeptide 12 from human glycophorin, hybrid-type glycopeptide 13 from hen ovalbumin, glycopeptide 14 from urine of fucosidosis were gifts from Drs Ph. DEBEIRE, A. KOBATA and G. STRECKER, respectively. All of these structures are related to glycoproteins with the N-glycosidic linkage (11). They were used, either native or modified by digestion with adequate exoglycosidases as described (10).

Affinity chromatography of glycopeptides on lectin-Sepharose column

Glycopeptides, N- [¹⁴C] acetylated according to KOIDE et al. (15), were applied on the column of lectin-Sepharose (10 cm x 1 cm) equilibrated in NaCl/Pi pH 7.2 in the case of LCA, VFA and PSA or in 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.2., containing 0.1M NaCl and MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ (1 mM each) in the case of immobilized Con A.

Elution was carried out first with the buffer at room temperature and at a flow rate of 10 ml/h, an then with the same buffer containing 0.01 M or 0.3 M methyl- α -D-glucopyranoside in the case of con A-Sepharose or 0.15 M methyl- α -D-glucopyranoside for LCA, VFA or PSA columns. 1,5 ml fractions were collected and aliquots were counted in 4 ml of Aqualyte scintillation liquid, using a Beckman LS-9000 scintillation counter.

Elution profiles

Four elution profiles can be obtained with the four above mentioned immobilized lectins.

1 - The non-retained profile (FNR) reflects a lack of interaction between the lectin and the glycopeptide.

2 - The retarded profile (FR) is obtained by elution with the starting buffer and reflects a weak affinity between the lectin and the glycopeptide.

3 - The glycopeptide can be weakly retained (FWR) by the lectin and is eluted with a low concentration (0.01 M) of α -methyl glucoside.

4 - The glycopeptide is strongly retained (FE) on the lectin column, and is eluted with a high concentration (0.3 M or 0.15 M) of α -methyl glucoside.

RESULTS AND DISCUSSION

Affinity chromatography of glycopeptides or related oligosaccharides on immobilized Concanavalin A

For immobilized Con A, our results confirm and extend previous data (5-8). From a complex mixture of glycopeptides with the N-glycosylamine linkage, four populations can be obtained :

1 - Tetra or triantennary glycopeptides (Structures 9-11 and 15 of fig. 1) or biantennary structures possessing a "bisecting" β -1,4-linked N-acetylglucosamine on the β -linked mannose residue (Structure 12) are not retained on Con A-Sepharose.

2 - Biantennary glycopeptides (Structures 1,2,7,8) are weakly retained and can be eluted with 0.01M α MG. One can also notice that biantennary structures possessing a "bisecting N-acetylglucosamine" residue can be weakly retained on the condition that at least one GlcNAc(β 1-2)-mannose sequence is unmasked on the glycopeptide (Structures 7,8 of Fig. 1). This point we find is important, for "classical" biantennary structures eluted in this fraction can be contaminated with immature or partially degraded biantennary structures possessing a "bisecting" N-acetylglucosamine residue.

We also find that the affinity of Con A-Sepharose towards an hybrid type glycopeptide (i.e. Structure 13) is interesting : the immobilized Con A possesses a relatively weak affinity for this kind of structure, which can be eluted from the column with 0.01M α MG but, the elution volume is larger than those obtained with biantennary glycopeptide (Structure 1).

3 - Oligomannosidic-type glycopeptides (Structure 4) are strongly retained on Con A-Sepharose and are eluted with a high concentration (0.3 M) of α -methyl glucoside. The high affinity of biantennary glycopeptides possessing two terminal non-reducing N-acetylglucosamine residues (Structures derived from 1 and 2) has also to be noticed. These structures are also eluted from the Con A

column with 0.3 M α MG, giving a broad, trailing profile. Same results were described by NARAMSINHAN *et al.* (7) and by BAENZIGER and FIETE (8).

4 - A retarded fraction can also be obtained with structures 3,5,6 of Fig. 1 and by increasing the column size from 10 to up to 70 ml, a mixture of these retarded glycopeptides can be further separated into three families (16). These glycopeptides with terminal non-reducing galactose residues possess either a "bisecting" β -GlcNAc residue or a fucose residue substituting an N-acetylglucosamine in C-3, or both giving steric hindrances which weakens the interaction with immobilized Con A.

We also find that the structure 14 which possesses only one α -mannose residue in a terminal non-reducing position, is weakly recognized by Con A-Sepharose. This retarded behavior we find for some structures is important, for these structures can represent either immature or partially degraded biantennary structures and from a metabolic point of view, it is important to have a rapid procedure for their isolation.

The chromatographic behaviour on immobilized Con A of oligosaccharides, obtained either by action of specific endo- β -N-acetylglucosaminidases, or by hydrazinolysis of the glycopeptides, is not modified by these treatments (12).

Affinity chromatography of glycopeptides on immobilized LCA, VFA, or PSA

As shown in Fig. 2, each glycopeptide family obtained from Con A-Sepharose can be further divided into two populations by chromatography on immobilized LCA, on the basis of the presence of a fucose residue α -1,6-linked on the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond.

As previously reported (9, 10, 17), immobilized LCA can interact with biantennary glycopeptides (Structures 2-3 of Fig. 1) or

with triantennary glycopeptides possessing an α -L-fucose residue at the C-6 position of the N-acetylglucosamine residue linked to the asparagine residue, but an important condition for this latter interaction to take place is that the third antennae substitutes the α -1,6-linked mannose of the innercore in the C-6 position. If this substitution is at the C-4 position of the α -1,3-linked mannose, immobilized LCA does not have any affinity for this new triantennary Structure 11) (17). However, in this connection, it was surprising to note that a tetraantennary glycopeptide isolated from human Factor VIII/ VON WILLEBRAND Factor (Structure 15 of Fig. 1) (18) interacts with the lectin (Fig. 2). This fact may be correlated with the presence of a single sialic acid residue, giving to the glycopeptide a conformation allowing the lectin to recognize its specific determinant.

We also find that LCA can, in contrast to Con A, interacts with biantennary structures possessing a "bisecting" N-acetylglucosamine (Structures 6, 7, 12) but always on the condition that these structures possess an α -L-fucose residue in C-6 position of the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine bond. However, if the presence of this α -1,6-linked fucose is prerequisite for the recognition by LCA, this condition is not a sufficient one, for as we previously demonstrated (9), glycans liberated from glycopeptides 2 or 3 by hydrazinolysis, are no longer retained or even retarded on immobilized LCA. This was also confirmed by YAMAMOTO *et al* (19).

Moreover, the concept of lectins, such as LCA, having two dominant monosaccharides (here α -D-mannose and α -L-fucose) can be postulated. In the case of LCA, one can notice that the "limit" glycopeptide recognized by the lectin has to possess two α -D-mannose residues (Structure derived from 2), for, Structure 14 which possesses only one of these α -D-mannose is not retained, nor retarded on immobilized LCA in spite of the presence of the α -1,6-linked fucose.

The specificity of immobilized PSA or VFA is identical to that of immobilized LCA. However, the affinity of these immobilized lectins seems lower than those of LCA, for glycopeptides bound on LCA are only retarded on PSA or VFA columns.

By affinity chromatography on immobilized concanavalin A and *Lens culinaris* agglutinin, we succeeded in isolating some glycopeptides, like the major one from rat liver plasma membrane (4) and several ones from human secretory IgA (16) whose the primary structure were determined.

Using the same immobilized lectins we also developed a fractionation method of glycopeptides isolated from normal and malignant uroepithelial cell lines (20).

CONCLUSIONS

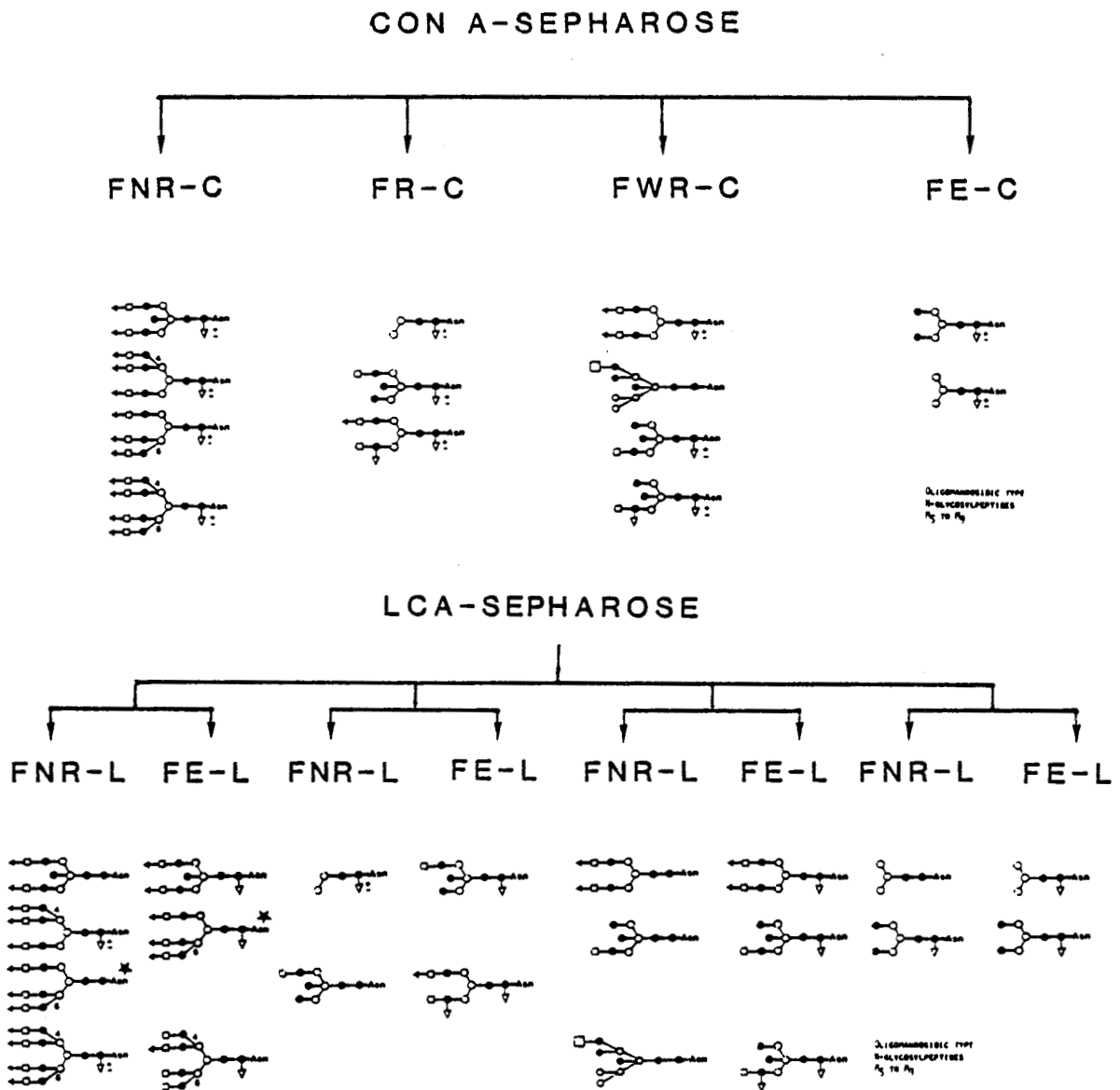
In conclusion, our results clearly show that four lectins (Con A, LCA, VFA and PSA) considered for a long time to be identical in terms of α -D-mannose or glucose specificity, possess the ability to recognize fine differences in more complex structures (10) and allow a very precise fractionation of complex mixtures of N-glycosylpeptides (9, 12) obtained either from soluble glycoproteins (16) or membrane-bound glycoproteins (20).

Although those fractionation procedure was also described and used by other groups (13, 17), the extensive calibration of the immobilized Con A and LCA, with numerous glycans of known structures we describe here, brings a considerable improvement to the procedure, allowing a more precise identification of minute quantities of glycopeptides of diverse origins, on the sole basis of a comparison of their elution profile with those of known glycanic structures.

REFERENCES

- 1 - LOTAN, R. and NICOLSON, G.L. (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 329-376.
- 2 - DEBRAY, H. and MONTREUIL, J. (1978) *Biochimie*, 60, 697-704.
- 3 - FINNE, J., KRUSIUS, T. and JARNEFELT, J., 27th International Congress of Pure and Applied Chemistry (ed. A. VARMAVUORI) 1980, Pergamon Press, Oxford, New-York, pp. 147-159.
- 4 - DEBRAY, H., FOURNET, B., MONTREUIL, J., DORLAND, L. and VLIEGENTHART, J.F.G. (1981), *Eur. J. Biochem.*, 115, 559-563.
- 5 - OGATA, S., MURUMATSU, T. and KOBATA, A. (1975), *J. Biochem.*, 78, 687-696.
- 6 - KRUSIUS, T. FINNE, J. and RAUVALA, H. (1976), *FEBS Letters*, 71, 117-120.
- 7 - NARAMSINHAN, S., WILSON, J.R., MARTIN, E. and SCHACHTER, H. (1979), *Can. J. Biochem.*, 57, 83-96.
- 8 - BAENZIGER, J.U. and FIETE, D. (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 2400-2407.
- 9 - DEBRAY, H. and MONTREUIL, J., *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (ed. T.C. BØG-HANSEN) 1981, Walter de Gruyter, Berlin - New-York, Vol. 1, pp. 221-230.
- 10 - DEBRAY, H. DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J., (1981), *Eur. J. Biochem.* 117, 41-55.
- 11 - MONTREUIL, J., (1980), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, 157-223.

- 12 - DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G. and MONTREUIL J., Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (ed. T.C. BØG-HANSEN and G.A. SPENGLER), (1983) Walter de Gruyter, Berlin - New-York, Vol. 3, pp. 335-350.
- 13 - CUMMINGS, R.D. and KORNFELD, S., (1982), J. Biol. Chem., 257, 11235-11240.
- 14 - MARCH, S.C., PARIKH, I. and CUATRECASAS, P., (1974), Anal. Biochem., 60, 149-152.
- 15 - KOIDE, N. and MURAMATSU, T., (1974), J. Biol. Chem., 249, 4897-4904.
- 16 - PIERCE-CRETEL, A., DEBRAY, H., MONTREUIL, J., SPIK, G. and VAN HALBEEK, H., MUTSAERS J.H.G.M., Vliegenthart, J.F.G, (1984), Eur. J. Biochem., 139, 337-349.
- 17 - KORNFELD, K., REITMAN, M.L. and KORNFELD, R., (1981), J. Biol. Chem., 256, 6633-6640.
- 18 - SAMOR, B., MICHALSKI, J.C., DEBRAY, H., MAZURIER, C., GOUEMAND, M., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G. and MONTREUIL, J., (1986), Eur. J. Biochem., 158, 295-298.
- 19 - YAMAMOTO, K., TSUJI, T. and OSAWA, T., (1982), Carbohydr. Res., 110, 283-289.
- 20 - DEBRAY, H., QIN, Z., DELANNOY, P., MONTREUIL, J., DUS, D., RADZIKOWSKI, C., CHRISTENSEN, B. and KIELER, J., (1986), Int. J. Cancer, 37, 607-611.



* According to KORNFIELD et al (17)

Fig. 2. Interaction of immobilized con A and LCA with glycopeptides with the N-glycosylamine linkage.

* *
* *

PUBLICATION N°6

AFFINITY OF FOUR IMMOBILIZED ERYTHRINA LECTINS TOWARD VARIOUS N-LINKED
GLYCOPEPTIDES AND RELATED OLIGOSACCHARIDES

CARBOHYDR. RES. (1986), 151, 359-370.

* *
* *

Carbohydrate Research, 151 (1986) 359-370
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands

AFFINITY OF FOUR IMMOBILIZED *Erythrina* LECTINS TOWARD VARIOUS N-LINKED GLYCOPEPTIDES AND RELATED OLIGOSACCHARIDES*

HENRI DEBRAY, JEAN MONTREUIL

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Associée au C.N.R.S. no. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France)

HALINA LIS, AND NATHAN SHARON

Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, 76100 (Israel)

(Received November 12th, 1985; accepted for publication, February 22nd, 1986)

ABSTRACT

The behavior of *N*-acetyllactosamine-type oligosaccharides and glycopeptides on columns of four different *Erythrina* agglutinins immobilized on Sepharose was examined. The sugar-binding specificity of the four lectins is very similar and is directed toward unmasked *N*-acetyllactosamine sequences, the main difference between the four lectins being the relative strength of interaction of the lectins with a given glycan. Substitution of the *N*-acetyllactosamine sequences by sialic acid residues, either at O-3 or O-6 of galactose completely abolishes the affinity of the lectins for the saccharides. The presence of one or several α -Fuc-(1 \rightarrow 3)-GlcNAc groups decreases or completely inhibits the interaction between the glycopeptides and the *Erythrina* lectins. Substitution of the β -mannose residue by an additional bisecting β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetylglucosamine residue decreases the affinity of the lectins for these structures as compared to the unsubstituted ones. Surprisingly, the affinity of the lectins for the oligosaccharides tested is higher than for the corresponding glycopeptides. Our findings show that, after careful calibration with well-defined oligosaccharides and glycopeptides, the immobilized *Erythrina* agglutinin-Sepharose columns provide valuable tools for the fractionation of *N*-acetyllactosamine-containing oligosaccharides and glycopeptides.

INTRODUCTION

Lectins are carbohydrate-binding and cell-agglutinating proteins of non-immune origin, which have been isolated from a variety of plants, animals, and microorganisms (for reviews, see refs. 1-3). Certain classes of lectins are often similar in terms of monosaccharide specificity, but frequently these proteins differ in terms of oligosaccharide and/or glycopeptide specificity^{4,5}. Therefore, before

*Dedicated to Roger W. Jeanloz.

H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS, N. SHARON

fractionation of oligosaccharides and glycopeptides of diverse origins by affinity chromatography using immobilized lectins, the precise structural requirements of the lectins should be carefully determined.

Recently, the specificity of *Erythrina cristagalli* agglutinin was examined by hapten inhibition of agglutination⁶, by a precipitin test using precursor human ovarian-cyst blood-group substance with *I* and *i* activities⁷, and by spectroscopic methods⁸. The lectin was demonstrated to be specific for the unsubstituted β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc structure that is present in the unsialylated branches of *N*-acetyl-lactosamine (or complex)-type *N*-linked carbohydrate units of glycoproteins.

Lectins from nine other species of *Erythrina* of widely different origins have been shown recently, by hapten inhibition of hemagglutination, also to belong to the D-galactose/*N*-acetylgalactosamine specificity-group⁹.

In this paper, we report the behavior of 27 *N*-acetyl-lactosamine-type oligosaccharides and glycopeptides on four different immobilized *Erythrina* agglutinins isolated from *E. cristagalli*, *E. corallodendron*, *E. lysistemon*, and *E. latissima*.

EXPERIMENTAL

Preparation of lectins. — Lectins from seeds of *E. cristagalli*, *E. corallodendron*, *E. latissima*, and *E. lysistemon* were purified by affinity chromatography on a column of lactose-derivatized Sepharose 4B as described^{6,9}. The lectins were coupled to Sepharose 4B that had been CNBr activated according to the procedure of March *et al.*¹⁰. The amounts of lectins bound to Sepharose were estimated to be 3 mg per mL of gel, by subtracting the amount of unbound protein found in the supernatant and washing solutions after coupling. Protein was determined by the method of Lowry *et al.*¹¹.

Origin of glycopeptides and oligosaccharides. — Oligosaccharides 1–3, shown in Table I, having ¹⁴C-labeled, terminal non-reducing D-galactosyl groups, were gifts from Dr. F. Piller (Centre National de Transfusion Sanguine, Paris). Oligosaccharides 4–18 and glycopeptide 25 of Table I, were isolated by Dr. G. Strecker from the urines of patients with various lysosomal diseases¹². Glycopeptides isolated from human serotransferrin (structure 19), from human lactotransferrin (structures 20–22), and from turtle-dove ovomucoid (structure 27) were gifts from Professor G. Spik. Glycopeptides 23 and 24, isolated from human α_1 -acid glycoprotein, were obtained from Professor B. Fournet. Hybrid-type glycopeptide (structure 26) isolated from hen ovalbumin was a gift of Dr. A. Kobata (Dept. of Biochemistry, University of Tokyo, Tokyo, Japan). The purity of all oligosaccharides and glycopeptides was established by ¹H-n.m.r. spectroscopy.

Labeling of glycopeptides and oligosaccharides. — Glycopeptides were labeled with [¹⁴C]acetic anhydride (7 mCi/mmol, C.E.A., France) according to Koide *et al.*¹³ and purified by gel filtration on a column of Biogel P2 equilibrated with water. Oligosaccharides 4–18 were labeled at the reducing-terminal *N*-

AFFINITY OF *Erythrina* LECTINS TOWARD N-LINKED GLYCOPEPTIDES

acetylglucosamine residues by reduction with tritiated potassium borohydride (50 Ci/mmol, C.E.A., France) according to ref. 14.

Affinity chromatography of oligosaccharides or glycopeptides on Erythrina lectin-Sepharose columns. — Radioactively labeled glycopeptides or related oligosaccharides ($2\text{--}30 \times 10^3$ d.p.m.; 0.1–10 nmol) were applied to the columns of lectin-Sepharose (1×10 cm) equilibrated at room temperature in a 10mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.15M sodium chloride (PBS). Elution was performed first with the foregoing buffer at a flow rate of 9 mL/h and then with PBS containing 0.15M D-galactose. Fractions of 1.5 mL were collected and aliquots counted by liquid scintillation in a Beckman LS-9000 scintillation counter. Recovery of radioactivity from the column was always >95%.

RESULTS AND DISCUSSION

The four elution profiles obtained when N-glycopeptides and related oligosaccharides are applied to immobilized *Erythrina* agglutinin-Sepharose columns are shown in Fig. 1. Oligosaccharides or glycopeptides are eluted at the void volume of the column (fraction FNR) because of a lack of interaction between the immobilized lectins and the saccharides. Other sugars, weakly interacting with the lectins, are eluted from the column by the starting buffer as retarded fractions (fractions FR) according to their affinity for the lectins: fractions FR1, FR2, and FR3 correspond to panels A, B, and C, respectively. Under the experimental conditions used, FR1 is eluted between fractions 1–15, FR2 between fractions 10–20, and FR3 as a broad peak between fractions 20–30.

There is a considerable overlap between fractions FR1 and FR2 when using a 1×10 cm column, which can be a limiting factor in the fractionation of oligosaccharides and glycopeptides of diverse origins. However, improvement in the separation of these fractions (FR1 and FR2) may be obtained by using a 0.5×20 cm column and by collecting 0.75-mL fractions (data not shown). The sharp elution profile obtained with 0.15M D-galactose in starting buffer (Peak FE; panel D) indicates a strong, specific interaction between the lectin and the bound saccharides.

Table I describes the behavior of 27 glycopeptides and oligosaccharides on the four immobilized *Erythrina* lectins. Generally, the four lectins interact with the same structural determinants, but the relative strengths of interaction, as demonstrated by the elution volumes, always follow the same order: *E. cristagalli* \geq *E. corallodendron* > *E. lysistemom* \geq *E. latissima*. The interactions of structures 13 or 23 are a good illustration of this fact. As previously shown by hapten-inhibition experiments of hemagglutination^{6,9}, the four *Erythrina* lectins belong to the D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine specificity-group and they exhibit high preference for N-acetyllactosamine. The data presented in Table I confirm these results and further demonstrate that the four *Erythrina* lectins interact with all of the glycopeptides or oligosaccharides on condition that they possess at least one

TABLE I
BEHAVIOR ON IMMobilIZED Erythrina LECTIN-SEPHAROSE (COLUMNS OF N-GLYCOsylPEPTIDES AND RELATED OLIGOSACCHARIDES

Com- pound no	Glycan structure	<i>E. cristagalli</i>	<i>E. corallio- dendron</i>	<i>E. lysiseimon</i>	<i>E. latissinia</i>
1	β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-3) β -Gal(1-4)-GlcOMe	FRI	FRI	FRI	FNR
2	β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-3) β -Gal(1-4)-GlcOMe	FRI	FRI	FRI	FNR
3	β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-6) β -Gal(1-4)-GlcOMe	FR3	FR3	FRI	FRI
4	β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Man(1-4)-GlcNAc	FR2	ND	ND	ND
5	α -NeuAc(2-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Man(1-4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR
6	α -NeuAc(2-6) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Man(1-4)-GlcNAc α -Man(1-6)	FNR	FNR	FNR	FNR
7	α -NeuAc(2-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-6) β -Man(1-4)-GlcNAc	FRI	FRI	FNR	FNR
8	α -NeuAc(2-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-6) β -Man(1-4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR
9	α -NeuAc(2-6) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-6) α -NeuAc(2-6) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-3) β -Man(1-4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR
10	α -NeuAc(2-6) β -Gal(1-4) β -GlcNAc(1-2) α -Man(1-6) β -Man(1-4)-GlcNAc	FNR	FNR	FNR	FNR

AFFINITY OF *Erythrina* LECTINS TOWARD N-LINKED GLYCOPEPTIDES

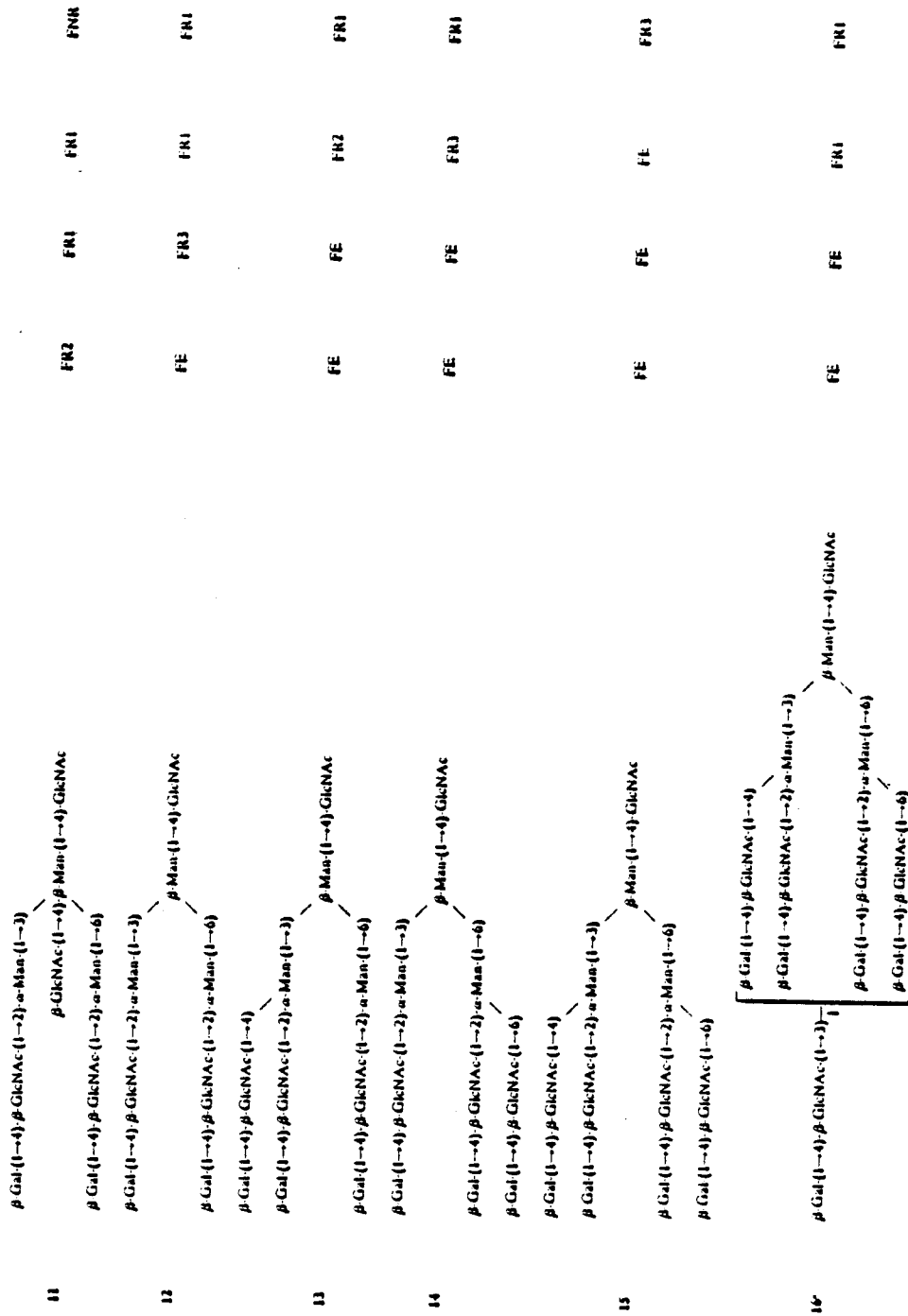
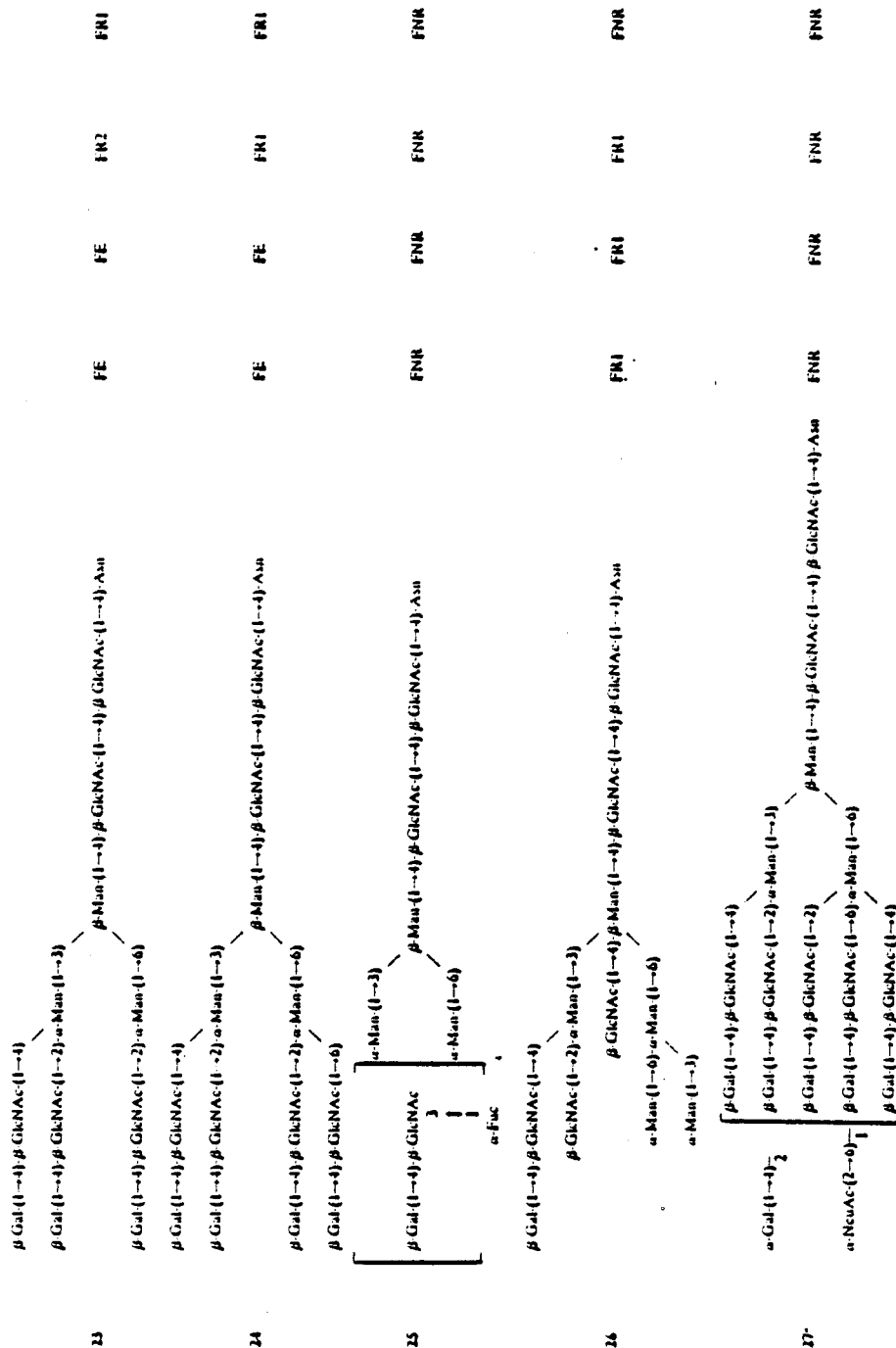


TABLE I (continued)

Compound no.	Glycan structure	<i>E. crassigalli</i>	<i>E. caudal-</i> <i>dentatus</i>	<i>E. laticornis</i>	<i>E. latissima</i>
17	$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow3)\begin{matrix} 2 \\ \left[\begin{array}{l} \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow6) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow6) \end{array} \right. \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc} \end{matrix}$	FE	FE	FRI	FRI
18	$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow3)\begin{matrix} 3 \\ \left[\begin{array}{l} \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow6) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow6) \end{array} \right. \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc} \end{matrix}$	FE	FE	FE	FE
19	$\alpha\text{-NeuAc}(2\rightarrow6)\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\text{Asn}$	FNR	FNR	FNR	FNR
20	$\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\text{Asn} \\ \begin{matrix} 6 \\ \\ \\ \alpha\text{-Fuc} \end{matrix}$	FRI	FRI	FRI	FRI
21	$\alpha\text{-NeuAc}(2\rightarrow6)\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\text{Asn} \\ \begin{matrix} 6 \\ \\ \\ \alpha\text{-Fuc} \end{matrix}$	FNR	FNR	FNR	FNR
22	$\alpha\text{-NeuAc}(2\rightarrow6)\beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-Man}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcNAc}(1\rightarrow4)\text{Asn} \\ \begin{matrix} 6 \\ \\ \\ \alpha\text{-Fuc} \end{matrix}$	FRI	FRI	FNR	FNR

AFFINITY OF *Erythrina* LECTINS TOWARD N-LINKED GLYCOPEPTIDES



*For oligosaccharides 16-18 and 27, brackets around the antennae mean that the exact position of the mono- or oligosaccharide residues (1-3 residues) substituting the basic structures is not known.

H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS, N. SHARON

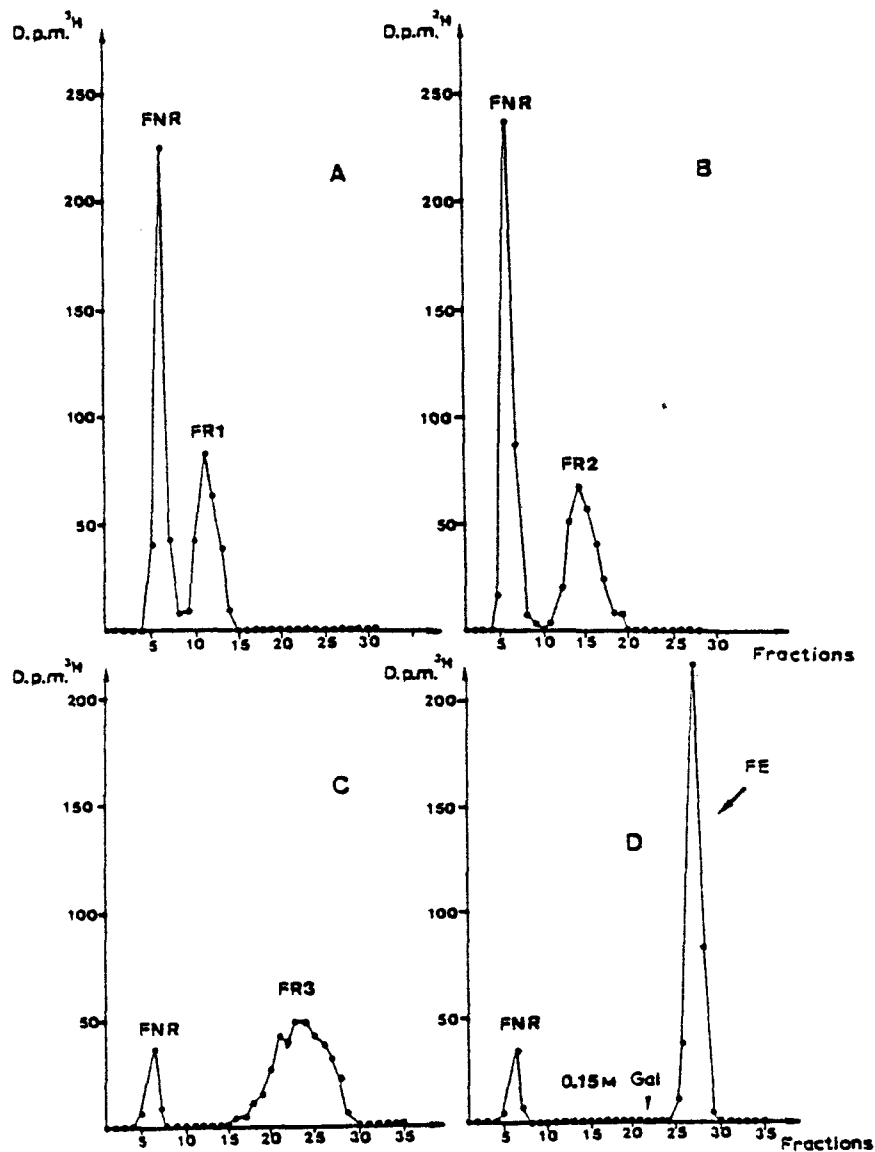


Fig. 1. Elution profiles of *N*-glycosylpeptides or related oligosaccharides on immobilized *Erythrina* lectin-Sepharose columns. Radioactively labeled glycopeptides or oligosaccharides ($2-30 \times 10^3$ d.p.m.; 0.1 to 10 nmol) were applied to the lectin-Sepharose columns (1×10 cm) equilibrated at room temperature in a 10mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.15M sodium chloride (PBS). Elution was first performed with this buffer at a flow rate of 9 mL/h and then with PBS containing 0.15M D-galactose. Fractions of 1.5 mL were collected and aliquots counted by liquid scintillation in a Beckman LS-9000 scintillation counter. A: profile obtained when structure 11 (9000 d.p.m. ^3H) was applied to immobilized *Erythrina corallo dendron* lectin-Sepharose column, giving the retarded fraction FR₁. B: profile obtained when structure 11 (9000 d.p.m. ^3H) was applied to immobilized *Erythrina cristagalli* lectin-Sepharose column, giving the retarded fraction FR₂. C: profile obtained when structure 12 (24000 d.p.m. ^3H) was applied to immobilized *Erythrina corallo dendron* lectin-Sepharose column, giving the retarded fraction FR₃. D: profile obtained when structure 13 (67,000 d.p.m. ^3H) was applied to immobilized *Erythrina cristagalli* lectin-Sepharose column, giving the eluted fraction FE.

AFFINITY OF *Erythrina* LECTINS TOWARD N-LINKED GLYCOPEPTIDES

unmasked β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow) sequence. The apparent lack of interaction of structures 1, 7, or 26 with *E. lysistemon* and *E. latissima* could be explained by assuming that, similarly to immobilized concanavalin A and *Ricinus communis* agglutinin^{15,16}, immobilized *Erythrina* lectins only bind carbohydrates having association constants in solution greater than a minimal value; for concanavalin A and the *R. communis* lectin, this value was found^{15,16} to be $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Substitution of the *N*-acetylglucosamine sequences by sialic acid residues, either at O-3 or O-6 of galactose completely abolishes the affinity of the lectins for any saccharide.

Generally, the affinity between the *Erythrina* lectins and oligosaccharides increases with the number of *N*-acetylglucosamine sequences present in the carbohydrate structure. This is particularly clear in the interactions between immobilized *E. lysistemon* and structures 12-15. Here again, however these interactions are modulated by the relative affinity of the immobilized lectins, and could be controlled by the amount of lectin coupled to Sepharose 4B.

It is noteworthy that immobilized *E. lysistemon* interacts more strongly with oligosaccharide 14 than with oligosaccharide 13. Both are triantennary *N*-acetylglucosamine-type glycans, but in oligosaccharide 14, one of the α -mannose residues is substituted by the third β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc at O-6, whereas in oligosaccharide 13, the substitution is at O-4. The freedom of rotation of carbohydrate structures around an α -(1 \rightarrow 6) glycosidic linkage as compared to the relative rigidity of the α -(1 \rightarrow 3) linkage¹⁷ may explain the higher affinity of *E. lysistemon* observed for structure 14. In contrast, using hapten inhibition of precipitin formation, Kaladas *et al.*⁷ found that *E. cristagalli* interacted more strongly with oligosaccharide 13 than with oligosaccharide 14.

The four lectins interact almost identically with the branched structure 3, which possesses *I* activity and in which the two β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc sequences are β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 6)-linked to a galactose residue, and with the biantennary oligosaccharide 12 in which the sequences are β -(1 \rightarrow 2)-linked to two mannose residues, *E. cristagalli* agglutinin presenting a slightly higher affinity for the biantennary oligosaccharide (structure 12). This is in line with the finding that there is no difference in the susceptibility of human *I* and *i* erythrocytes to agglutination by the *E. cristagalli* lectin (Lis and Sharon, unpublished results).

The binding sites of the *Erythrina* lectins specifically recognize only one β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc sequence, and the fact that oligosaccharides 3 or 12, containing two such disaccharide structures, interact more strongly with the lectins confirms the ability of either sugar determinant to react with a single binding-site, as proposed previously⁷. However, oligosaccharide 2, which possesses two such determinants but in a linear structure, interacts more weakly with the immobilized lectins than the branched biantennary oligosaccharides 3 or 12, thus confirming that each binding-site accommodates only one *N*-acetylglucosamine residue. In this connection, it is noteworthy that the binding site of *Datura stramonium* agglutinin

H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS, N. SHARON

appears to accommodate relatively large oligosaccharides and possesses the ability to interact with two repeating *N*-acetylglucosamine units¹⁸.

Substitution of the β -mannose residue by an additional β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetylglucosamine residue (structure 11) decreases the affinity of the *Erythrina* lectins for this kind of structure as compared to the unsubstituted one (structure 12). In this respect the *Erythrina* lectins are similar to RCA¹⁹ and, to some extent, to Con A^{15,19}.

Surprisingly, the affinity of the four *Erythrina* lectins seems slightly higher for biantennary oligosaccharides (structure 12) than for the corresponding glycopeptides (structure 20). In the same way, *E. lysistemon* and *E. lutissima* possess a lower affinity for the tetraantennary glycopeptide (structure 24) than for the corresponding oligosaccharide (structure 15). In contrast, many other lectins, e.g. *Lens culinaris* agglutinin or *Griffonia simplicifolia* agglutinin II, exhibit a higher affinity for glycopeptides than for related oligosaccharides^{5,19}. This could be explained by the fact that the glycan-amino acid linkage leads to structure more rigid than those of the oligosaccharides¹⁷. However, the presence of charged groups on asparagine could also affect the binding.

The presence of one or several fucosyl residues linked α -(1 \rightarrow 3) to the peripheral *N*-acetylglucosamine residues of multibranching saccharides of the *N*-acetylglucosamine type decreases (structure 22) or completely abolishes (structure 25) the interaction between the glycosylpeptide and the immobilized *Erythrina* lectins. Similar results have been previously obtained by hapten inhibition of hemagglutination induced by *E. cristagalli* agglutinin, showing that substitution of the β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc sequence by α -L-fucose residues diminishes its inhibitory activity⁷. Such influence of α -Fuc-(1 \rightarrow 3)-GlcNAc on binding to Con A and to erythro-agglutinating, as well as leuko-agglutinating lectins from *Phaseolus vulgaris*, has also been reported previously^{20,21}.

Immobilized *E. cristagalli*, *E. corallodendron*, and *E. lysistemon* possess a weak affinity toward a hybrid-type glycopeptide from hen ovalbumin (structure 26), which presents a β -Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc sequence accessible to the lectins. However, the *Erythrina* lectins do not show any affinity for a penta-antennary glycopeptide from turtle-dove ovomucoid (structure 27), which possesses two unmasked *N*-acetylglucosamine sequences, and two *N*-acetylglucosamine sequences substituted each by an α -D-galactose residue and one such sequence substituted by an α -NeuAc residue, perhaps because of steric hindrance introduced by these substituting residues.

CONCLUSION

Our results confirm and extend previous results obtained by hapten inhibition of hemagglutination^{6,9} and show that the four *Erythrina* lectins examined in this study are very similar with respect to specificity for *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides, the main difference between the four lectins being their relative

AFFINITY OF *Erythrina* LECTINS TOWARD N-LINKED GLYCOPEPTIDES

strength of interaction with a given glycan. This similarity of lectins isolated from various species of *Erythrina*, as well as the amino acid-sequence homologies⁹, indicates a high degree of conservation during evolution for these proteins. Various lectins from the *Viciae* tribe seem also to have been conserved at the level of their sugar-binding sites during evolution, as they exhibit a very similar fine specificity toward glycans of the *N*-acetylglucosamine type²².

This study also shows that, after careful calibration with well-defined oligosaccharides and glycopeptides, the four immobilized *Erythrina* lectins could provide valuable tools for the fractionation and structural analysis of *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides and glycopeptides of diverse origins.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (UA no. 217: Relation structure-fonction des constituants membranaires, Director: Prof. J. Montreuil), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contracts 134.012 and 332.029), by the Ministère de l'Industrie et de la Recherche (Contract 82-L-1099), and by a grant to N.S. and H.L. from the United States-Israel Binational Science Foundation. The authors are very grateful to Drs. B. Fournet, A. Kobata, F. Piller, G. Spik, and G. Strecker for providing the glycopeptides and oligosaccharides used in this study.

REFERENCES

- 1 H. LIS AND N. SHARON, in M. SELA (Ed.), *The Antigens*, Vol. 4, Academic Press, New York, 1977, pp. 429-529.
- 2 I. J. GOLDSTEIN AND C. E. HAYES, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35 (1978) 128-340.
- 3 H. LIS AND N. SHARON, in V. GINSBURG AND P. ROBBINS (Eds.), *Biology of Carbohydrates*, J. Wiley, New York, 1984, pp. 1-86.
- 4 S. KORNFELD AND C. FERRIS, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 2614-2619.
- 5 H. DEBRAY, D. DECOUT, G. STRECKER, G. SPIK AND J. MONTREUIL, *Eur. J. Biochem.*, 117 (1981) 41-55.
- 6 J. L. IGLESIAS, H. LIS AND N. SHARON, *Eur. J. Biochem.*, 123 (1982) 247-252.
- 7 P. M. KALADAS, E. A. KABAT, J. L. IGLESIAS, H. LIS AND N. SHARON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 217 (1982) 624-637.
- 8 H. DE BOECK, F. G. LOONTJENS, H. LIS AND N. SHARON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 234 (1984) 297-304.
- 9 H. LIS, F. J. JOUBERT, AND N. SHARON, *Phytochemistry*, 24 (1985) 2803-2809.
- 10 S. C. MARCH, I. PARIKH, AND P. CUATRECASAS, *Anal. Biochem.*, 60 (1974) 149-152.
- 11 O. H. LOWRY, N. H. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 12 G. STRECKER AND J. MONTREUIL, *Biochimie*, 61 (1979) 1199-1246.
- 13 N. KOIDE AND T. J. MURAMATSU, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 4897-4904.
- 14 S. TAKASAKI AND A. KOBATA, *J. Biochem. (Tokyo)*, 76 (1974) 783-789.
- 15 J. U. BAENZIGER AND D. FIETE, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 2400-2407.
- 16 J. U. BAENZIGER AND D. FIETE, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 9795-9799.
- 17 J. MONTREUIL, *Biochem. Soc. Trans.*, 11 (1983) 134-136.
- 18 R. D. CUMMINGS AND S. KORNFELD, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 6253-6260.
- 19 H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK, AND J. MONTREUIL, in T. C. BØG-HANSEN AND G. A. SPENGLER (Eds.), *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol. 3, Walter de Gruyter, Berlin & New York, 1983, pp. 335-350.

H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS, N. SHARON

- 20 K. YAMASHITA, Y. TACHIBANA, T. NAKAYAMA, M. KITAMURA, Y. ENDO, AND A. KOBATA, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 5635-5642.
- 21 U. V. SANTER AND M. C. GLICK, *Carbohydr. Res.*, 120 (1983) 197-213.
- 22 H. DEBRAY AND P. ROUGE, *FEBS Lett.*, 176 (1984) 120-124.

* *
* *

PUBLICATION N°7

A NEW ISOLATION PROCEDURE OF THE LECTIN FROM THE MUSHROOM
ALEURIA AURANTIA AND FURTHER STUDY OF ITS SPECIFICITY TOWARD VARIOUS
GLYCOPEPTIDES AND OLIGOSACCHARIDES

GLYCOCONJUGATE J., (1987) (SUBMITTED FOR PUBLICATION).

* *
* *

SUMMARY

A new procedure for isolating a fucose-specific lectin from the mushroom Aleuria aurantia is described. The fine specificity of the purified lectin has been determined by inhibition of agglutination of human red blood cells by various glycopeptides and oligosaccharides and by studying the affinity of the immobilized lectin toward glycopeptides and oligosaccharides. Results of inhibition of hemagglutination study show that the lectin presents the highest affinity toward α -1,6-linked fucose residues. Immobilized Aleuria aurantia agglutinin interacts strongly with all N-glycosylpeptides or related glycans possessing an α -L-fucose residue linked at the C-6 position of the N-acetylglucosamine residue involved in the glycosylamine linkage. In addition, presence of α -1,3-linked fucose residues greatly enhances the affinity of the lectin for the α -1,6-fucosylated glycans. Our results show that the immobilized Aleuria lectin is a powerful tool for the resolution of the microheterogeneity of fucosylated glycopeptides and glycans of the N-acetyllactosamine type.

INTRODUCTION

It has been recently demonstrated that some lectins (Lens culinaris, Vicia faba, Pisum sativum and Lathyrus ochrus agglutinins) with a specificity toward α -D-mannose or α -D-glucose possess, in fact, the ability to recognize fine differences in more complex glycans belonging to N-glycosylproteins and that the presence of an α -L-fucose residue substituting in C-6 the N-acetylglucosamine residue involved in the glycosylamine linkage is a major determinant for binding (1-3). This property can be used to fractionate glycopeptides of the N-acetyllactosamine type possessing this kind of α -L fucose residue (4). However, the above lectins cannot be called L-fucose-specific lectins. As two well known L-fucose specific lectins (i.e. Ulex europeus agglutinin I and Lotus tetragonolobus agglutinin) possess a very weak affinity toward glycans of the N-acetyllactosamine type substituted either by an α -1,6- or an α -1,3-linked L-fucose residue or both (1,5), an α -L-fucose-specific lectin with such a specificity could be a very powerful tool for the fractionation of fucosylated glycans.

In the present study, we describe a new procedure to isolate an α -L-fucose specific lectin from the fruiting bodies of the mushroom Aleuria aurantia discovered by KOCHIBE and FURUKAWA (6,7). In addition, we have precised the fine specificity of the lectin by inhibition of hemagglutination carried out with various glycopeptides and oligosaccharides and by studying the affinity of the immobilized lectin toward glycopeptides and oligosaccharides of the N-acetyllactosamine type.

The results we obtained confirm those of YAMASHITA et al. (8) showing that the lectin presents the higher affinity for N-glycosylpeptides or related oligosaccharides possessing an α -L-fucose residue at the C-6 position of the N-acetylglucosamine residue. However, we report additional observations demonstrating that the presence of external α -1,3-fucosyl residues greatly enhances the affinity of the lectin for the oligosaccharides.

So, the immobilized Aleuria aurantia agglutinin (AAA) is a powerful tool for the resolution of the microheterogeneity of glycopeptides of the N-acetyllactosamine type and related oligosaccharides due to the presence of Gal (β 1-4) [Fuc(α 1-3)]GlcNAc or/and Fuc(α 1-6)GlcNAc (β 1-N)Asn residues.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Fruiting bodies of Aleuria aurantia were collected locally and stored at -20°C until used. N-(ϵ -aminocaproyl)- β -L-fucosylamine, prepared according to BLUMBERG et al. (9) was a gift from Prof. Nathan Sharon (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël). 1-[^{14}C]acetic anhydride (7 mCi/mM) was obtained from the C.E.A. (Saclay, France) and Aqualyte liquid scintillation cocktail from Baker (Deventer, The Netherlands)

Origin of glycoasparagines and oligosaccharides

Glycopeptides isolated from human serotransferrin (structure 6 of Table III), from human lactotransferrin (structures 7 and 8 of Table III) as well as the native glycoproteins were gifts of Prof. Geneviève Spik. Fucosylated glycopeptides (structures 9 to 11 of Table III) as well as a fucosylated oligosaccharide (structure 12 of Table III) were isolated by Dr. Gérard Strecker from the urine of patients with fucosidosis (10). Glycopeptides 21 to 24 of Table IV were isolated by Dr. Annick Pierce-Crétel from human milk sIgA. Human α_1 -acid glycoprotein as well as glycopeptide 25 of Table IV were gifts of Prof. Bernard Fournet. In order to determine the affinity of immobilized AAA, all these glycopeptides were N-[^{14}C] acetylated according to Koide et al. (11). N-acetyllactosamine-type glycans from human lactotransferrin (structures 26 and 27 of Table IV) were obtained by hydrazinolysis of the native glycoprotein, followed by N-reacetylation with [^{14}C] acetic anhydride of the liberated glycans. Oligosaccharides 13 to 20 of Table III were isolated by Dr. Gérard Strecker

from human milk.

Preparation of the fucosyl resin

N-(ϵ -aminocaproyl)- β -L-fucopyranosylamine was coupled to CNBr-activated Sepharose 4B by the method of MARCH et al. (12) at a concentration of 5 mg per ml of settled gel. The capacity of the fucosyl resin toward Aleuria aurantia agglutinin was found to be 2 mg of protein per ml of gel.

Purification of the Aleuria aurantia agglutinin

All operations were carried out at 4°C. Frozen fruiting bodies (100 g) were homogenized in 500 ml of phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS) with a blender. The homogenate was kept at 4°C overnight under stirring and then centrifuged at 10,000 g for 20 mn in a Beckman J 21-B refrigerated centrifuge. The clear orange supernatant was collected. The pellet was rehomogenized with 150 ml of PBS, kept for 2 h at 4°C and centrifuged as above. Solid ammonium sulfate was added to the combined supernatants at 4°C to obtain 80% saturation according to KOCHIBE and FURUKAWA (6). After overnight stirring at 4°C, the precipitate was collected by centrifugation at 10,000 g for 20 mn, dissolved into a small volume of PBS and dialyzed against PBS at 4°C for 48 h.

After centrifugation, half of the dialysate was applied on a Sepharose 4B-N-(ϵ -aminocaproyl-fucopyranosylamine) column (2 x 7 cm) at 4°C, at a flow rate of 9 ml/h, and 4 ml fractions were collected. The column was washed with 10mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.15M sodium chloride (PBS) until no absorbing material could be detected in the effluent. Then, the bound lectin was released by washing the column with 50mM L-fucose in PBS. The fucose eluate was dialyzed against distilled water at 4°C for 48 h and lyophilized.

Polyacrylamide gel electrophoresis

The purity and the molecular weight of the purified lectin were controlled and determined by SDS slab gel electrophoresis according to LAEMMLI (13) in a 5 to 25% polyacrylamide gradient gel.

Chemical analysis

Amino acid analysis. Purified AAA was hydrolyzed in vacuo at 100°C in 6M HCl for 24 h. One drop of 1% phenol was added to prevent excessive degradation of tyrosine. Amino acid analyses were performed on a Beckman 119 CL amino acid analyser.

Carbohydrate analysis. Analysis of monosaccharides was performed by gas liquid chromatography (GLC) according to ZANETTA et al. (14) after methanolysis with methanol/0.5M HCl, at 80°C for 20 h. Released sugars were trifluoroacetylated with trifluoroacetic anhydrid in presence of dichloromethane (50 µl of each) before gas chromatography on a Varian chromatograph serie 1400 with a Silicone OV-210 column.

Quantitative determination of protein was performed according to LOWRY et al. (15).

Determination of contaminating α -L-fucosidases.

The presence of contaminating α -L fucosidases in the purified lectin preparation was determined by incubation of an aliquot of the lectin solution (1 mg/ml) with 400µl of a 5 mM p-nitrophenyl fucoside as a substrate in 0.01M citrate/phosphate buffer. After 30 mn at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 1 ml of 1M Na₂ CO₃ and liberated p- nitrophenol was measured spectrophotometrically at 400 nm.

Incubation was also performed with GalNAc (α 1-3) Fuc(α 1-2) Gal(β 1-4)[Fuc (α 1-3)] Glc as a natural substrate. Characterization of the liberated L-fucose in the reaction mixture was carried out by thin-layer chromatography (TLC)

on Silicagel 60 plates (Merck) employing n-butanol/acetic acid/water (2:1:1, v/v) as solvent and continuous flow for 5 h. The sugars were located by spraying the plate with an orcinol sulfuric reagent (solution of 2 g orcinol in 1 l sulfuric acid/water, 20:80 (v/v) followed by heating at 105°C for 10 mn.

Hemagglutination test.

Agglutination of human red blood cells and inhibition of hemagglutination by oligosaccharides, glycopeptides or glycoproteins was carried out in Linbro mitrotiter U-plates titertek (Linbro Scientific Co, Hamden, U.S.A.) by a two fold serial dilution technique (16). Results are expressed as the minimum concentration (mM) required to completely inhibit 4 hemagglutinating doses.

Immobilization of AAA on Sepharose 4B.

AAA was coupled to Sepharose 4B activated according to the procedure of MARCH et al. (12), at a concentration of 3 mg of lectin per ml of gel.

Affinity chromatography of glycopeptides on AAA - Sepharose 4B column.

N- [¹⁴C] acetylated glycopeptides (2 to 30 x 10³ d.p.m ; 0.1 to 10 nmoles) were applied to the column of AAA-Sepharose (0.5 cm x 20 cm) equilibrated at room temperature in a 10 mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.15 M sodium chloride (PBS). Elution was carried out, first with the above buffer at a flow rate of 9 ml/h and then with PBS containing 50mM L-fucose. 1.5 ml fractions were collected and aliquots counted by liquid scintillation in a Beckman LS-9000 scintillation counter. Recovery of radioactivity from the column was always above 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of *Aleuria aurantia* agglutinin.

A typical elution profile of the 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction chromatographed on the Sepharose 4B-N-(ϵ -aminocaproyl- β -L-fucopyranosylamine) column is shown in Fig. 1. About 80 mg of the purified lectin is obtained from 100 g of mushrooms (Table I). The fucosyl resin may be used for many successive purifications without any decrease in efficiency.

The bound protein released from the fucosyl resin with 50mM L-fucose gives two polypeptide bands with an apparent molecular weight of $31,000 \pm 1,000$ daltons when analyzed by polyacrylamide slab gel electrophoresis in the presence of SDS and 5 % β -mercaptoethanol (Fig. 2). These results differ slightly from those obtained by Kochibe and Furukawa (6) who found a single polypeptide band using polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS and β -mercaptoethanol, according to Weber and Osborn (17). On the basis of this result and of gel filtration analysis, authors concluded that the native lectin probably existed as a dimer of two identical subunits. The more resolute Laemmli's system shows that the native lectin contains two slightly different subunits differing in their charge as it has been previously found for soybean agglutinin (18).

Incubation of aliquots of the lectin solution with either 5mM *p*-nitrophenyl-fucoside or with a natural fucosylated substrate shows that the purified lectin is free of any contaminating α -L-fucosidases.

The amino acid composition of the lectin given in Table II indicates a high content of hydroxylic and acidic aminoacids and the absence of sulfur-containing aminoacids. Analysis of monosaccharides by gas liquid chromatography demonstrates that the *Aleuria aurantia* agglutinin is not glycosylated. These two series of results entirely confirm those of Kochibe and Furukawa (6).

Hemagglutination inhibition tests.

The results of the inhibition of hemagglutination by Aleuria aurantia agglutinin by various oligosaccharides are presented in Table III and can be summarized as follows. The best inhibitor is a penta-fucosylated glycoasparagine (Structure 11) which possesses four fucose residues α -1,3-linked to the N-acetylglucosamine of four N-acetyllactosamine residues (X-antigenic determinants) and one fucose residue α -1,6-linked to the N-acetylglucosamine of the glycosylamine linkage. A glycoasparagine isolated from human lactotransferrin which possesses an α -1,6-linked fucose and only one X-antigenic determinant (Structure 8 of Table III) is 8-fold less inhibitory than structure 11. However, it is 4-fold more inhibitory than structure 7 which possesses only the α -1,6-linked fucose residue. Compound 10 which is also α -1,6- fucosylated is 2-fold more inhibitory than the structure 7, but 4-fold less than the glycoasparagine 9. This finding indicates that substitution of the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn sequence limits the accessibility to the lectin, reflecting a small binding site for the lectin. It is also noteworthy that fucoside 12 which lacks the Fuc(α 1-6)GlcNAc (β 1-N)Asn sequence, but possesses a fucose residue α -1,3-linked to an N-acetylglucosamine residue is not inhibitory at a maximal concentration of 1.66mM. Unsubstituted "type-2 chain" oligosaccharide, containing an α -1,2-linked fucose residue on the terminal galactose, H determinant structure (Oligosaccharide 14 of Table III), "type-1 chain" oligosaccharide with an α -1,4-linked fucose substituting the penultimate N-acetylglucosamine residue, Lewis a determinant (Oligosaccharide 16) and "type-1 chain" oligosaccharide 17 which possess both fucose residues (Lewis b determinant) are not inhibitory at a maximal concentration of 1.66 mM. However, "type-2 chain" oligosaccharide 18 (Y hapten), containing an α -1,2-linked fucose residue on the terminal galactose and another α -1,3-linked fucose substituting the penultimate N-acetylglucosamine residue, is at least

32-fold more inhibitory than oligosaccharide 14. Substitution of the terminal non-reducing galactose of oligosaccharide 18 with an α -1,3-linked N-acetylgalactosamine residue, giving oligosaccharide 20 (A-antigenic determinant) or with an α -1,3-linked galactose (oligosaccharide 19 ; B-antigenic determinant) decreases the inhibitory power 4-fold or 16-fold respectively, indicating a limited binding site for the lectin that accommodates only two or three sugar residues. In this respect, it is noteworthy that the trisaccharide 15 which possesses an α -1,2-linked fucose on a terminal reducing galactose is a relatively good inhibition of hemagglutination.

Summarizing, the results concerning the inhibition by various oligosaccharides of the hemagglutination by Aleuria aurantia agglutinin, show that the lectin presents the higher affinity toward α -1,6-linked fucose residues, the presence of which is a prerequisite for the interaction of the lectin with the oligosaccharide. The lectin can recognize also α -1,2-linked fucose, but only when the fucose is substituting a sugar residue in a terminal reducing position as in trisaccharide 15.

The lectin also reacts with α -1,3-linked fucose residues but, only when the fucose substitutes a sugar residue, like the glucose, in a terminal reducing position, as in oligosaccharides 18,19 and 20.

The affinity of the lectin increases with the number of fucose residues present on the oligosaccharide indicating the existence of an "avidity effect" (19) : glycopeptide 11, with four external α -1,3-linked fucose and the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn sequence is 8-fold more inhibitory than glycopeptide 8 which possesses only one external α -1,3-linked fucose residue. From these results, it appears that AAA presents some analogies with lectins such as LCA, VFA or PSA for which the α -1,6-linked fucose is a major determinant for binding (1,2). However, in contrast to AAA, the above three lectins need also the presence of the mannotriose core with both α -1,3- and α -1,6-linked mannose residues either free or substituted at position C-2 and C-6 (2,5,20). Fucose α -1,3-linked to the external N-acetylglucosamine residue

does not play any role in the binding of LCA, PSV or VFA, but it considerably increases the affinity of AAA.

Affinity chromatography of N-glycosylpeptides and related oligosaccharides on immobilized AAA.

The four elution profiles of affinity chromatography of N-glycosylpeptides and related oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia agglutinin-Sepharose column are shown in Fig. 3. Glycopeptides and oligosaccharides which do not interact with the immobilized lectin are eluted with the void volume and constitute the "non-retained fractions" (FNR of panel A) ; compounds weakly interacting with the lectin are eluted from the column by the starting buffer as "retarded fractions" (FR) according to their affinity for the lectin : fractions FR-1 and FR-2 of panels B and C, respectively. Under the experimental conditions we used, FR1 is eluted between fraction 7 to 12 and FR-2 between fractions 10 to 22. The sharp eluted fraction (FE of panel D) obtained with 50mM L-fucose in starting buffer indicates a strong interaction between the lectin and the bound saccharides. Table IV describes the behavior of 13 glycopeptides and oligosaccharides on the immobilized Aleuria aurantia agglutinin. It could be summarized as follows : immobilized AAA interacts strongly with all the glycopeptides possessing an α -L-fucose residue at the C-6 position of the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine linkage. However, the interaction is modulated by the complexity of the glycan structure. For example, glycopeptides 9,10 and 11 are strongly bound to the lectin column and are eluted with PBS containing 50mM L-fucose while glycopeptide 7 is strongly retarded and not retained. On this point, our results are not in agreement with those obtained by Yamashita et al. (8) who found that binding was not affected by the structures of the outer chain moieties. On the contrary, our results fit well with those obtained by hapten inhibition of hemagglutination and indicate that the lectin binding site can accommodate only two to three saccharide units.

It is noteworthy that glycans released by hydrazinolysis/N-reacetylation from human lactotransferrin (structures 26 and 27) are still recognized by the immobilized lectin with the same affinity than the native glycopeptides (structures 7 and 8). This result confirm those obtained by Yamashita et al. (8) and shows that immobilized Aleuria agglutinin is very useful for the fractionation of glycans containing α -1,6-linked fucose released from N-glycosylproteins by hydrazinolysis. From this point of view, AAA differs from LCA, PSA and VFA for which such glycans liberated by hydrazinolysis and still possessing the α -1,6-linked fucose determinant are no longer retarded on VFA and PSA (20,21) or retained on immobilized LCA (21,22). Substitution of the β -mannose residue by a "bisecting" N-acetylglucosamine residue (glycopeptide 22) decreases the affinity of the Aleuria lectin as compared to the unsubstituted one (structure 21). In this respect, the Aleuria lectin is similar to RCA_T (5), to Erythrina lectins (23) and, to some extent, to Con A (5,24). However, this result does not agree with that obtained by Yamashita et al. (8) who claimed that the binding was not affected by the presence of a bisecting N-acetylglucosamine residue.

The presence of at least one external Fuc(α 1-3)GlcNAc group (X-antigenic determinant) together with the Fuc(α 1-6)-GlcNAc sequence on a same glycopeptide (structure 8) or glycan (structure 27) greatly enhances the interaction between the oligosaccharides and the Aleuria lectin. In this respect, immobilized Aleuria lectin represents a very useful tool for the fractionation of the two glycans found in human lactotransferrin : mono-fucosylated glycopeptide (structure 7) or glycan (structure 26) are strongly retarded on the immobilized lectin, but the difucosylated glycopeptide (structure 8) or glycan (structure 27) are firmly bound and must be eluted from the column with 50mM L-fucose.

Structures 24 and 11, with respectively one and four Fuc(α 1-3)GlcNAc groups together with the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn sequence interact also strongly with the immobilized lectin.

This ability of Fuc(α 1-3)GlcNAc groups to enhance the interaction between the α -1,6-fucosylated glycopeptides or glycans and the immobilized Aleuria lectin was not emphasized by Yamashita et al. (8).

It is also noteworthy that the triantennary glycopeptide 25, possessing only one Fuc(α 1-3)GlcNAc group, interacts weakly with the immobilized lectin, but that the bisected biantennary glycopeptide 23 which possesses also this group does not interact at all with the lectin.

Conclusion

In the present study, we describe a new procedure to isolate a fucose specific lectin from the mushroom Aleuria aurantia discovered by Kochibe and Furukawa (6), using an affinity support prepared by covalently linking N-(ϵ -aminocaproyl)- β -L-fucopyranosylamine to Sepharose 4B.

The fine specificity of the purified lectin has been determined by inhibition of agglutination of human red blood cells by various glycopeptides and oligosaccharides and by studying the affinity of the immobilized lectin toward N-glycosylpeptides and related oligosaccharides. Results of hapten inhibition of hemagglutination induced by the lectin show that the lectin presents the higher affinity toward α -1,6-linked fucose residues. The lectin interacts also with oligosaccharides containing both α -1,2- and α -1,3-linked fucose residues (Y hapten), but does not react with large oligosaccharides containing an α -1,2-, or an α -1,4-linked fucose residue or both (Lewis b hapten). In this respect, Hindsgaul et al. also found that Lewis b structures do not react appreciably with another fucose-binding lectin from Ulex europeus whereas the H-type 2-related Y hapten is a good inhibitor (25). Substitution of the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn sequence which is a good inhibitor of hemagglutination, decreases the affinity of the lectin for the new structure, indicating a limited size of the lectin binding site, however, the presence of a single or of several Fuc(α 1-3)GlcNAc groups together with the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn sequence greatly enhances the

interaction between the glycopeptides and the Aleuria lectin, indicating the existence of an "avidity effect".

Immobilized Aleuria aurantia agglutinin interacts strongly with N-glycosyl-peptides of the N-acetyllactosamine type or related glycans with an α -1,6-linked fucose on the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine linkage as previously described by Yamashita et al. (8). However, the nature of the substitution of the outer chain moieties as well as the presence of a bisecting N-acetylglucosamine residue modulate the interactions between the oligosaccharides and the lectin. Moreover, the fucosylation at the C-3 position of N-acetylglucosamine residues of N-acetyllactosamine groups greatly enhances the affinity of the lectin for the glycans.

This study also shows that, after careful calibration with well defined oligosaccharides and glycopeptides, the immobilized Aleuria aurantia agglutinin could provide a valuable tool for the resolution of the microheterogeneity due to the presence of different fucose substituents of glycopeptides of the N-acetyllactosamine type and related oligosaccharides.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.A n° 217 : Relation structure-fonction des constituants membranaires, Director : Pr. J. Montreuil), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, by the Ministère de l'Education Nationale and by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. The authors are very grateful to Drs B. Fournet, A. Pierce-Cretel, G. Spik and G. Strecker for providing the glycopeptides and oligosaccharides used in this study.

References

- 1 - H. DEBRAY, D. DECOUT, G. STRECKER, G. SPIK, and J. MONTREUIL,
Eur. J. Biochem., 117 (1981) 41-55.
- 2 - K. KORNFELD, M.L. REITMAN, and R. KORNFELD, J. Biol. chem., 256
(1981) 6633-6640.
- 3 - H. DEBRAY, and P. ROUGE, FEBS-Lett., 176 (1984) 120-124.
- 4 - A. PIERCE-CRETEL, H. DEBRAY, J. MONTREUIL, and G. SPIK, H. VAN
HALBEEK, J.H.G.M. MUTSAERS, and J.F.G. VLIEGENTHART, Eur. J.
Biochem., 139 (1984) 337-349
- 5 - H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK, and J. MONTREUIL, in T.C.
BØG-HANSEN and G.A. SPENGLER (Eds.), lectins-Biology,
Biochemistry, clinical Biochemistry, Vol 3. Walter de Gruyter,
Berlin - New York, 1983, pp. 335-350.
- 6 - N. KOCHIBE, and K. FURUKAWA, Biochemistry, 19 (1980) 2841-2846.
- 7 - N. KOCHIBE, and K. FURUKAWA, Methods Enzymol., 83 (1982)
373-377.
- 8 - K. YAMASHITA, N. KOCHIBE, T. OHKURA, I. UEDA, and A. KOBATA,
J. Biol. chem., 260 (1985) 4688-4693.
- 9 - S. BLUMBERG, J. HILDESHEIM, J. YARIV, and K.J. WILSON,
Biochim. Biophys. Acta, 264 (1972) 171-176.
- 10 - G. STRECKER, and J. MONTREUIL, Biochimie, 61 (1979) 1199-1246.
- 11 - N. KOIDE, and T.J. MURAMATSU, J. Biol. chem., 249 (1974)
4897-4904.
- 12 - S.C. MARCH, I. PARIKH, and P. CUATRECASAS, Anal Biochem., 60 (1974)
149-152.
- 13 - U.K. LAEMMLI, Nature, 227 (1970) 680-685.
- 14 - J.P. ZANETTA, W.C. BRECKENRIDGE, and G. VINCENDON, J. chromatogr.,
69 (1972) 291-304.
- 15 - O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL, J. Biol.
chem., 193 (1951) 265-275.
- 16 - I. MATSUMOTO, and T. OSAWA, Arch. Biochem. Biophys., 140 (1970)
484-491.
- 17 - K. WEBER, and M. OSBORN, J. Biol chem., 244 (1969) 4406-4412.
- 18 - R. LOTAN, R. CACAN, M. CACAN, H. DEBRAY, W.G. CARTER, and
N. SHARON, FEBS-Lett., 57 (1975) 100-103.
- 19 - M. MONSIGNY, A.C. ROCHE, C. SENE, R. MAGET-DANA, and F. DELMOTTE,
Eur. J. Biochem., 104 (1980) 147-153.

- 20 - Y. KATAGIRI, K. YAMAMOTO, T. TSUJI, and T. OSAWA, *carbohydr. Res.*, 129 (1984) 257-265.
- 21 - H. DEBRAY, and J. MONTREUIL, *J. Biosci.*, 5, suppl 1 (1983) 93-100.
- 22 - K. YAMAMOTO, T. TSUJI, and T. OSAWA, *carbohydr. Res.*, 110 (1982) 282-289.
- 23 - H. DEBRAY, J. MONTREUIL, H. LIS, and N. SHARON, *carbohydr. Res.*, 151 (1986) 359-370.
- 24 - J.U. BAENZIGER, and D. FIETE, *J. Biol. chem.*, 254 (1979) 2400-2407.
- 25 - O. HINDSGAUL, T. NORBERG, J. LE PENDU, and R.U. LEMIEUX, *Carbohydr. Res.*, 109 (1982) 109-142.

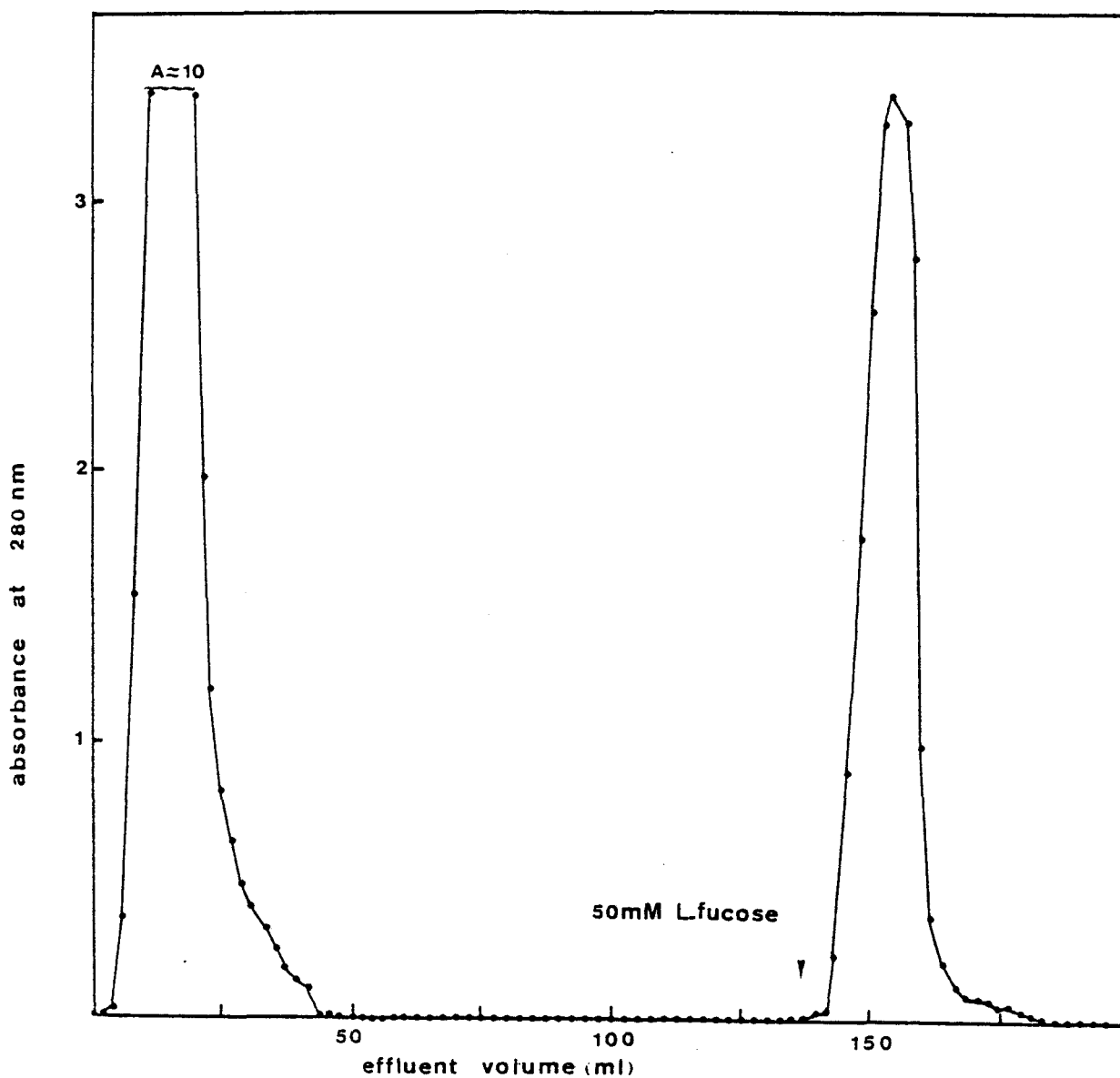


Fig. 1. Isolation of the Aleuria aurantia agglutinin on Sepharose 4B-N-(ϵ -aminocaproyl)- β -L-fucopyranosylamine column. An extract of Aleuria mushroom (prepared from 100 g of fruiting bodies as described in materials and methods) was applied to the column (2 x 7 cm). The column was washed with a 10mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.15M sodium chloride (PBS) and 50mM L-fucose in the same buffer was then added (arrow). Chromatography was carried out at 4°C at a flow rate of 9 ml/h.

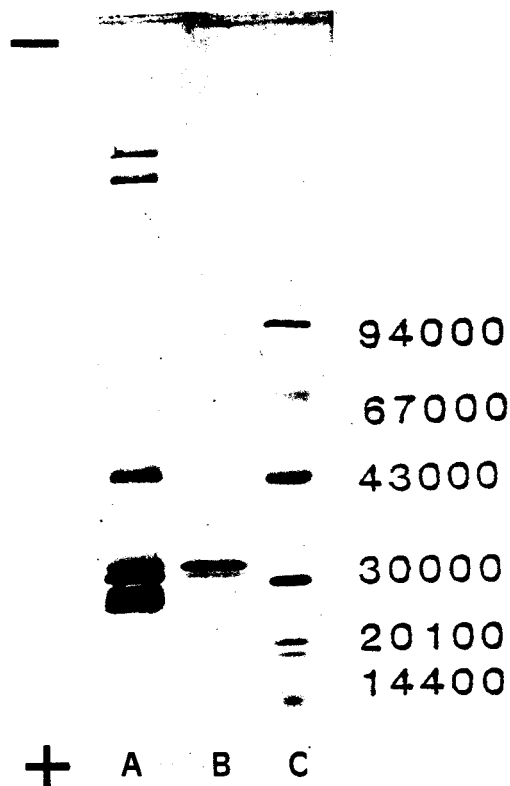


Fig. 2. SDS slab gel electrophoresis of the 80% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ fraction prepared from Aleuria aurantia (A) and of the purified lectin (B) in a 5 to 25 % polyacrylamide gradient gel according to Laemmli (13). On line C were applied molecular weight markers for SDS gel calibration (Pharmacia, France) : phosphorylase b (94,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100) and α -lactalbumine (14,400).

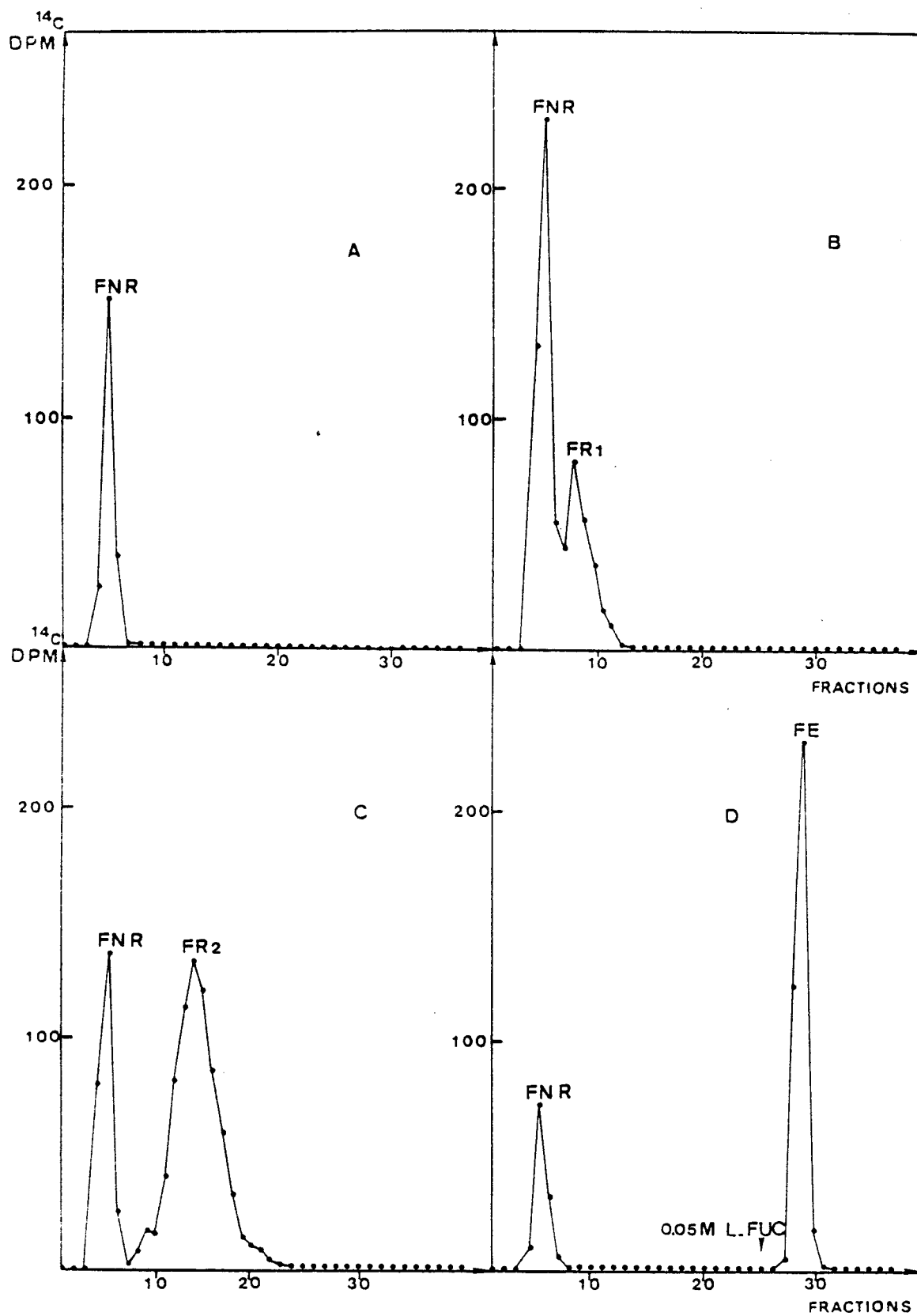


Fig. 3. Elution profiles of N-glycosylpeptides or related oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia agglutinin-Sepharose column.

Table I. Purification of lectin from Aleuria aurantia fruiting bodies (100 g)

Fraction	Total protein (mg)	Titer	Specific hemagglutinating activity (titer/mg)	Protein recovery (%)
Crude extract	4 600	8	1	100
80 % (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	1 200	256	35	26
Sepharose 4B-N-(ε- aminocaproyl)fucopyranosyl- amine)affinity chromatography	80	128	135	1.7

Table II : Amino Acid compositions of Aleuria aurantia agglutinins A and B. (expressed as number of residues per mole assuming a molecular weight of 62,000 for the lectin).

A: composition from this study ; B : composition according to Kochibe and Furukawa (6).

Amino Acids	Number of Residues estimated	
	A	B
Alanine	62.7	52.6
Valine	29.6	33.3
Leucine	29.6	24.8
Isoleucine	34.9	42.5
Proline	33.1	33.8
Phenylalanine	18.6	18.1
Glycine	83.4	89.6
Serine	79.6	75.7
Threonine	36.7	37.5
Tyrosine	24.2	26.1
Aspartic acid	51.8	49.7
Glutamic acid	60.9	57.6
Lysine	26	28.5
Arginine	24.2	23.1
Histidine	7.1	3.7
Methionine	0	0
Half-cystine	0	0
Total	602.4	596.6

Table IV. Behavior on immobilized *Aleuria aurantia* agglutinin - Sepharose of N-glycosylpeptides and related oligosaccharides.

Reference of compounds(a)	Glycan structures	FNR	FR-1	FR-2	FE
23	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn}$	+			
6	$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn}$	+			
25	$\begin{array}{l} \text{Fuc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn}$		+		
22	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \begin{cases} \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{cases} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$			+	
7	$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$			+	
26	$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$			+	
9	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
10	$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-6) \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
21	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \begin{cases} \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{cases} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
24	$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \begin{cases} \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{cases} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
8	$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
11	$\left[\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \right]_4 \begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+
27	$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \Rightarrow \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\alpha 1-6) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-6) \end{array}$				+

(a) According to the nomenclature of Table III for structures 6 to 11.

CONCLUSIONS.

Nous pouvons résumer les résultats que nous avons obtenus sur la spécificité des lectines immobilisées de la manière suivante :

1/ La spécificité des lectines immobilisées est parfois très différente de celle des lectines en solution.

a - Ainsi, des oligosaccharides ne seront pas retenus sur une colonne de lectine de Lentille immobilisée alors que les mêmes oligosaccharides sont de bons inhibiteurs de l'hémagglutination induite par cette lectine. Par contre, la lectine immobilisée présente une grande affinité pour les glycopeptides renfermant les déterminants qu'elle reconnaît spécifiquement. Cela implique que lors d'un fractionnement, la libération des glycanes par coupure chimique (hydrazinolyse, hydrolyse alcaline) ou enzymatique (N-glycanases spécifiques) est à proscrire si l'on ne veut pas perdre le pouvoir de résolution d'un fractionnement ultérieur à l'aide d'autres lectines immobilisées comme la lectine de Lentille ou la lectine du germe de Blé (WGA).

b - La présence d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire sur un glycanne de type N-acétyllactosaminique biantenné ne l'empêche pas d'être un bon inhibiteur de la réaction d'agglutination induite par la Concanavaline A. Au contraire, la présence de ce résidu inhibe totalement l'interaction de cet oligosaccharide ou de ce glycopeptide avec la Concanavaline A immobilisée.

c - La présence d'un résidu de fucose lié en (α 1-6) sur l'osamine impliquée dans la liaison N-glycosylamine n'est pas nécessaire pour qu'un glycopeptide de type N-acétyllactosaminique soit un bon inhibiteur de l'hémagglutination provoquée par la lectine de lentille. Au contraire, sa présence est indispensable pour que le même glycopeptide soit retenu sur une colonne de lectine de Lentille immobilisée.

2/ Sur la base des observations que nous avons effectuées, nous avons mis au point un schéma de fractionnement des glycopeptides des N-glycosylprotéines fondé sur la combinaison de la Concanavaline A

(Con A) et de la lectine de Lentille (LCA) immobilisées sur Sepharose 4B. Les résultats d'un tel fractionnement sont illustrés par la figure (p.166). Le fractionnement peut être poursuivi en utilisant d'autres lectines immobilisées, en particulier les lectines de Ricin RCA_I et RCA_{II} , d'Erythrina et la lectine d'Aleuria aurantia (AAA).

3/ Les lectines de Ricin (RCA_I) ou de différentes espèces d'Erythrina reconnaissent spécifiquement les séquences N-acétyllactosaminiques. Leur substitution par des résidus d'acide sialique liés en ($\alpha 2-6$) ou en ($\alpha 2-3$) abolit totalement l'affinité des lectines d'Erythrina pour ces glycanes. La substitution des résidus de N-acétyllactosamine par des résidus d'acide sialique liés en ($\alpha 2-3$) abolit totalement l'interaction de la lectine de Ricin RCA_I avec ces structures, alors que la substitution par des résidus d'acide sialique liés en ($\alpha 2-6$) ne diminue que légèrement l'affinité de la lectine pour les glycanes.

La présence d'une ou de plusieurs séquences $Fuc(\alpha 1-3)GlcNAc$ diminue ou inhibe totalement l'affinité des lectines d'Erythrina envers les glycanes qui en renferment. De même, la substitution du résidu de β -mannose par un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire diminue très fortement l'affinité des lectines pour ces structures. Les lectines N-acétyllactosamine-spécifiques représentent donc un outil très performant pour le fractionnement de mélanges complexes d'asialooligosaccharides ou d'asialoglycopeptides de type N-acétyllactosaminique.

4/ La lectine immobilisée d'Aleuria aurantia (AAA) représente un autre outil permettant de résoudre le problème très délicat lié à la microhétérogénéité due au fucose des glycanes de type N-acétyllactosaminique.

5/ Enfin, dans la publication suivante (publication N°8) faisant partie d'un ouvrage récent consacré à la méthodologie des glycoconjugués, nous présentons quelques méthodes d'immobilisation de lectines ainsi que les protocoles expérimentaux à suivre et les précautions à prendre lors du fractionnement de glycoprotéines ou de glycopeptides d'origines diverses à l'aide de ces lectines immobilisées.

*
* *

PUBLICATION N°8

USE OF IMMOBILIZED LECTINS.

In : "CARBOHYDRATE ANALYSIS" : A PRACTICAL APPROACH, eds, M.F. CHAPLIN
AND J.F. KENNEDY, IRL Press, OXFORD-WASHINGTON D.C., 1986, CHAPTER 5,
P.158-174.

*
* *

Carbohydrate analysis

a practical approach

Edited by

M F Chaplin

Department of Biotechnology, South Bank Polytechnic,
London SE1 0AA, UK

J F Kennedy

Research Laboratory for the Chemistry of Bioactive
Carbohydrates and Proteins, Department of Chemistry,
University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

 **IRL PRESS**
Oxford · Washington DC

4. USE OF IMMOBILIZED LECTINS

4.1 Introduction to the use of lectins

Lectins are 'sugar-binding proteins or glycoproteins of non-immune origin which agglutinate cells and/or precipitate glycoconjugates'. They bear at least two sugar-binding sites, the presence of which explains the ability of lectins to precipitate polysaccharides, glycoproteins and glycolipids and to agglutinate cells. As these interactions are often reversed by monosaccharides or glycosides, lectins are powerful tools for isolating sugar components and cells either in their soluble or immobilized form (for reviews, see ref. 24 and 25).

The carbohydrate specificity of a given lectin is usually established by the method of fixation-site saturation in which different sugars are tested for their ability to inhibit either haemagglutination or precipitation of polysaccharides and/or glycoconjugates by the lectin. Another procedure consists of the determination of the association constant by equilibrium analysis.

The specificity of a lectin is defined in terms of the best monosaccharide inhibitor. The results from such studies lead to the classification of lectins into groups some of which are given in *Table 1*.

Originally, it was thought that lectins recognized monosaccharides in the non-reducing external position. However, it was further demonstrated that in most cases complex oligosaccharides are several thousand-fold more potent as 'haptens' toward lectins than monosaccharides themselves so that the concept of the 'lectino-dominant monosaccharide' must be replaced by that of the 'lectino-dominant oligosaccharide' (28 - 31). Moreover, we know that the lectins are able to bind 'laterally' to glycoprotein glycans.

Table 1. Lectins commonly used for glycoprotein study and classified according to their monosaccharide specificity

α -D-Mannose, α -D-Glucose	
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A
<i>Lens culinaris</i>	LCA
β -D-Galactose, N-acetyl- β -D-galactosamine	
<i>Ricinus communis</i>	RCA _I
	RCA _{II}
<i>Glycin max</i> (Soybean)	SBA
<i>Arachis hypogaea</i> (Peanut)	PNA
α -D-Galactose, N-acetyl- α -D-galactosamine	
<i>Griffonia simplicifolia I</i>	GSA _I
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA
N-Acetyl- β -D-glucosamine	
<i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ)	WGA
α -L-Fucose	
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
<i>Ulex europaeus I</i>	UEA _I
α -N-Acetylneuraminic acid	
<i>Limulus polyphemus</i> (Limulin)	

The structures which are actually recognized by lectins commonly used in biochemical and biological research are described in *Table 2*. In addition, we must keep in mind that the affinity of immobilized lectins toward free and/or conjugated sugars is absolutely unforeseeable and cannot be deduced at all from the results obtained with the lectins in solution from haemagglutination experiments (28,29). For example, oligosaccharides are able to inhibit the haemagglutination by LCA, (see *Tables 1* and *2* for lectin abbreviations) but only glycoasparagines, glycopeptides and glycoproteins are fixed on the immobilized LCA. So, oligosaccharides liberated by hydrazinolysis or alkaline cleavage are not retained by this latter material. In the same way, the presence of the 'bisecting' N-acetylglucosamine residue (see *Figure 5.3*) does not influence the inhibitory effect of oligosaccharides on the haemagglutination by Con A, but hinders the fixation of glycans on immobilized Con A (31).

In conclusion, the only method for determination of the binding specificity of any immobilized lectin consists of the study of the behavior of free and conjugated oligosaccharides of well defined primary structure such as those listed in *Table 3*.

4.2 Immobilization of lectins

Numerous methods have been proposed for preparing immobilized lectins, many of which are now available from different suppliers (Pharmacia, Miles, E.Y. Laboratories, I.B.F.). Lectins directly coupled to CNBr-activated agarose are the most popular. However, immobilized lectins can be easily prepared using agarose, Sepharose 4B or Ultrogel, at a concentration of 2 – 10 mg of lectin per ml of settled gel. Immobilization and subsequent use of the immobilized lectins requires some essential rules.

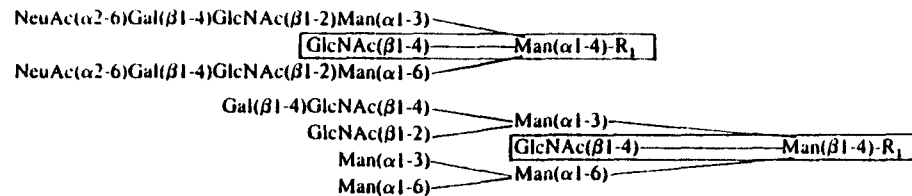
- (i) During the coupling reactions, lectin binding sites must be protected by addition of the monosaccharide specific of the lectin (haptens sugar).
- (ii) In some cases, non-specific (hydrophobic or ionic) adsorption of glycoproteins

Table 2. Specificity of commonly used lectins towards oligosaccharide sequences belonging to N-glycosylproteins.

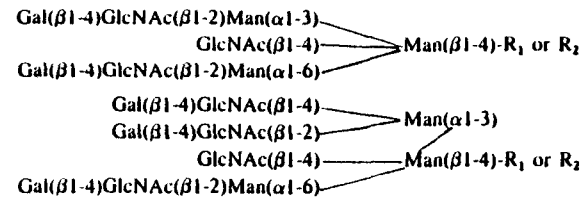
Lectin	Specificity
Concanavalin A (Con A)	<ul style="list-style-type: none"> GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) Man(α1-2)Man(α1-2)Man(α1-3) Man(α1-3) Man(α1-6) Man(β1-4)-R₁ Man(β1-4)-R₂
<i>Leus culinaris</i> (LCA)	<ul style="list-style-type: none"> Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) GlcNAc(β1-2) Man(α1-3) Man(α1-6) Man(β1-4)-R₁ GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) GlcNAc(β1-4) Man(α1-6) Man(β1-4)-R₂
<i>Ricinus communis</i> agglutinin ^b (RCA ₁)	<ul style="list-style-type: none"> Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Man(β1-4)-R₁ or R₂
Leukoagglutinating lectin from <i>Phaseolus vulgaris</i> (L-PHA)	<ul style="list-style-type: none"> Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Man(β1-4)-R or R₂ Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Man(α1-3) Man(β1-4)-R₁ or R₂

Table 2. continued.

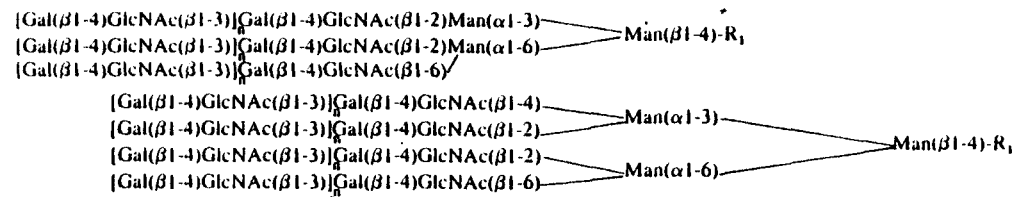
Wheat germ agglutinin (WGA)^b



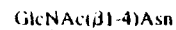
Erythroagglutinating lectin from *Phaseolus vulgaris* (E₄-PHA)



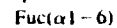
Datura stramonium agglutinin (DSA)



Ulex europaeus agglutinin I (UEA_I)



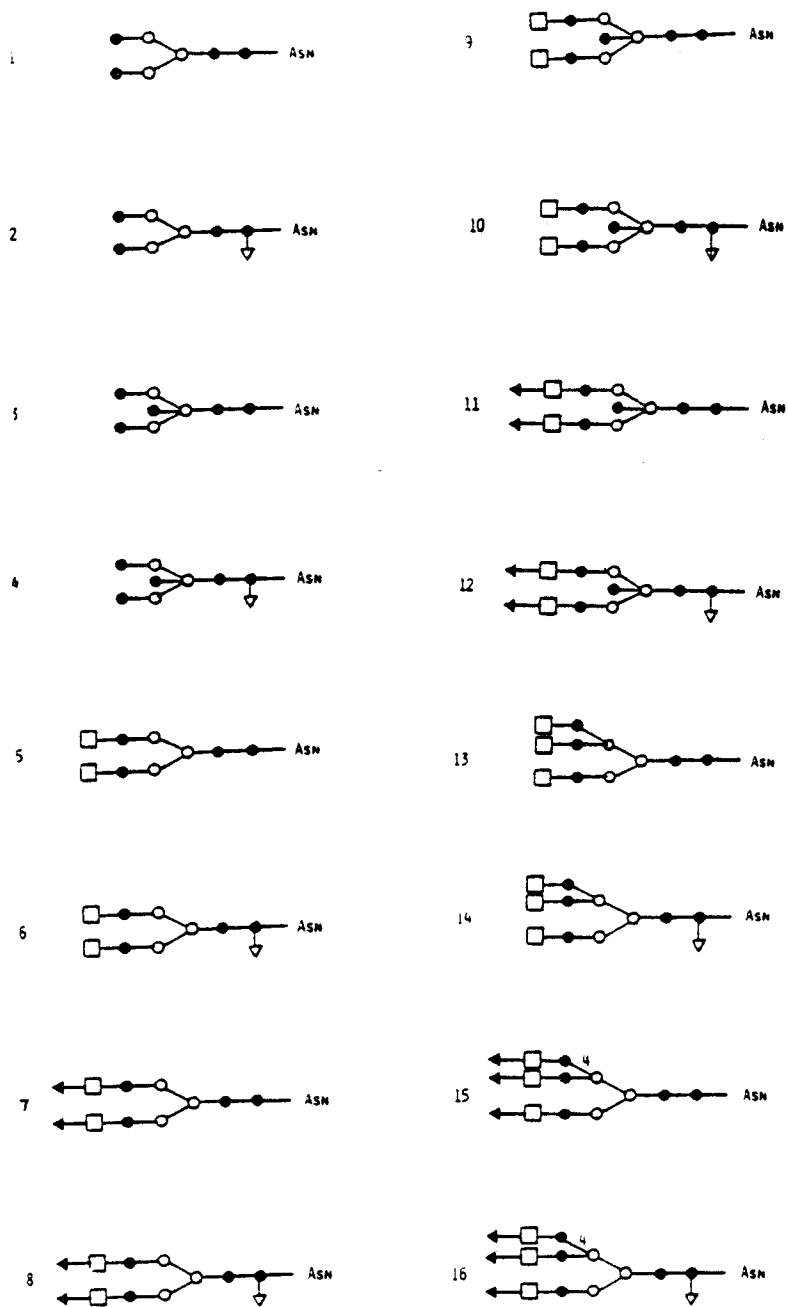
Lotus tetragonolobus agglutinin (LTA)

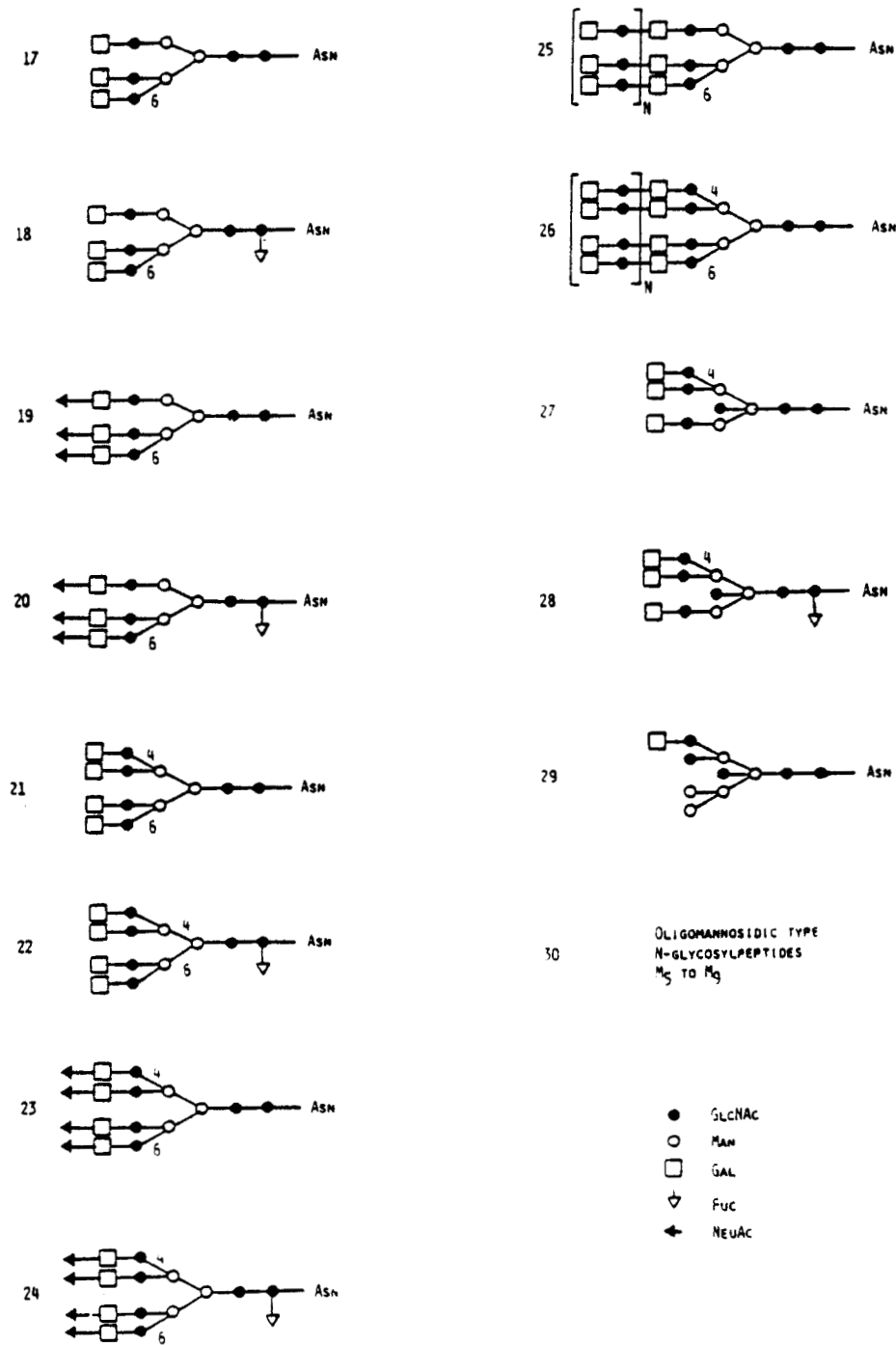


^aR₁: GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn; R₂: GlcNAc(β1-4)[Fuc(α1-6)]GlcNAc(β1-N)Asn.

^bSequences in boxes are the minimal oligosaccharide structure necessary for lectin recognition.

Table 3. Structure of *N*-glycosylpeptides used for studying immobilized lectin specificity.





Some of the structures are detailed in *Figures 4-7* and in *Table 2*. Numbers given in the schemes refer to glycosidic linkages: 4: β -1,4; 6: β 1-6. In all schemes, the antennae linked to the α -1,3 and α -1,6 mannose residues are the upper and the lower ones, respectively.

on the immobilized lectins has been observed. In order to avoid this phenomenon, new types of immobilization matrices of lectins have been developed, such as polyacrylic-hydrazido-agarose on which lectins can be coupled with glutaraldehyde, giving a stable, non-leaking, uncharged and hydrophilic absorbent.

- (iii) Immobilized lectins must be stored at 4°C in buffer containing 0.02% sodium azide as a bacteriostatic agent, in order to avoid any loss of activity for several years.
- (iv) Some lectins possess metal-binding sites and the presence of metal ions is important to induce a proper conformation of the lectin needed for carbohydrate binding. For example, Con A needs Mn^{2+} and Ca^{2+} for full activity so that the buffers used for the affinity chromatography on this lectin must contain $MnCl_2$ and $CaCl_2$ (1 mM each).
- (v) In order to limit non-specific interactions between glycoproteins and immobilized lectins, such as ionic interactions, the buffers must possess a moderate ionic strength (0.1 – 1 M in NaCl).

4.2.1 Activation of Sepharose 4B with CNBr according to March *et al.* (32) and coupling of lectins

- (i) Wash 50 ml of wet Sepharose 4B beads (Pharmacia) on a sintered glass filter with 1 l of chilled distilled water and transfer into a beaker cooled in an ice-bath.
- (ii) Mix 100 ml of ice cold 2 M K_2CO_3 solution with the wet filtered Sepharose beads, under gentle magnetic stirring. Add 6.25 ml of a freshly prepared CNBr solution in acetonitrile (2 g/ml) and maintain at 0°C for 2 min in a well ventilated hood.
- (iii) Quickly pour the entire reaction mixture into a sintered glass filter funnel and wash extensively with 3 l of ice-cold distilled water. Transfer the wet activated Sepharose into a 200 ml measuring cylinder and add the ice-cold lectin solution to be coupled (0.25 g of lectin dissolved in 0.5 M NaCl – 0.2 M $NaHCO_3$ – 0.2 M haptenic sugar, pH 8.5). Stopper the measuring cylinder and gently stir for 24 h at 4°C. Filter the reaction mixture through a sintered glass filter funnel and wash the coupled gel extensively with 1 l each of ice-cold distilled water, 0.1 M $NaHCO_3$ and water, successively.
- (iv) Block the unreacted iminocarbonate groups by suspending the preparation in 100 ml of a 1 M glycine solution, under gentle stirring, for 3 h at room temperature.
- (v) Estimate the approximate amount of uncoupled lectin by measuring the absorbance at 280 nm (protein content) of the reaction mixture and recover the immobilized lectin by filtration, after a 24 h coupling period.
- (vi) Wash the glycine-blocked gel extensively with cold distilled water and then with the equilibration buffer containing 0.02% sodium azide. Store the immobilized lectins at 4°C in this equilibration buffer until used.

4.2.2 Immobilization of lectins on polyacrylyhydrazido-sepharose (33)

- (i) To washed polyacrylyhydrazido-Sepharose (Miles), add 3 vol. of 10% (w/v)

- glutaraldehyde solution, with gentle stirring, for 4 h at 4°C.
- (ii) Dissolve the lectin to be coupled in 0.1 M NaHCO₃ – 0.9 M NaCl – 0.1 M haptenic monosaccharide (4–5 mg of lectin/ml of coupling buffer) and add to the derivatized gel (4–5 mg of lectin/ml of settled gel beads). Stir the mixture slowly overnight.
 - (iii) Wash the gel with phosphate-buffered saline (PBS) and add NaBH₄ dissolved in a gel volume of PBS (0.5 mg NaBH₄/ml of settled gel), for 3 h at 4°C. After washing with PBS containing 0.02% sodium azide, store the immobilized lectin at 4°C.

4.3 Fractionation of glycoproteins

4.3.1 General remarks

Affinity chromatography on different immobilized lectins has been widely used to purify various glycoproteins and many examples have been reviewed elsewhere (34,35) so that we shall restrict ourselves to some particular points which could be useful during such fractionations.

(i) *Use of crossed immuno-affinity electrophoresis of glycoproteins as a guide for lectin affinity chromatography:* Crossed immuno-affinity electrophoresis (CIAE), introduced by Bøg-Hansen (36), combines the interaction between lectins and glycoproteins in the first dimension electrophoretic step with electrophoresis into an antibody-containing gel in the second dimension. This sensitive and powerful technique can give important information: (a) about interaction between a given lectin and the glycoprotein to be purified, a good correlation being generally observed between the results obtained by affinity electrophoresis and by affinity chromatography on the immobilized lectin; and (b) about the microheterogeneity of carbohydrate moieties of the glycoproteins to be purified. However, parameters such as column binding capacity and elution conditions cannot be predicted from the affinity electrophoresis experiments.

(ii) *Binding capacity of the immobilized lectins and problems of the elution:* Variations in the amount, as well as in the quality of the lectin immobilized on a gel, is an important factor influencing the binding of glycoproteins. Affinity differences are often observed between different commercially available immobilized Con A preparations. Similarly, affinity of WGA-Sepharose 4B for glycoproteins varies with the density of lectin coupled to the gel. This implies the calibration of the column before using a new batch of immobilized lectin with well known glycoproteins or glycopeptides such as α_1 -acid glycoprotein containing di-, tri- and tetra-antennary glycans (see Figure 5.7) and thyroglobulin containing glycans of the oligomannosidic type (see Figure 4.1). Three fractions are generally obtained, reflecting relative affinities of the immobilized lectins for the glycoproteins.

- (a) The *non-reactive compounds* are eluted at the void volume of the column with the equilibration buffer. This fraction, when the exact capacity of the immobilized lectin is not known, must be submitted to a new cycle of adsorption and elution

on the same column, to be sure that the immobilized lectin was not saturated during the first run.

- (b) The *weakly reactive components* give a fraction which is obtained by elution with the equilibration buffer. The separation of weakly differently interacting glycoproteins can even be obtained by using a long and thin column which is more efficient than a wider column containing the same volume of immobilized lectin.
- (c) A *strongly reactive fraction* which is specifically desorbed by addition of the appropriate sugar at a concentration between 0.1 and 0.5 M. According to the commercial origin of the immobilized lectin, a weakly reactive glycoprotein can be either bound and eluted with the lectin-reactive fraction or unbound and eluted with the lectin-non-reactive fraction.

The spatial conformations of the native glycoprotein or non-specific hydrophobic interactions may modulate the accessibility of some glycans to the lectin, which can explain artefactual lectin-weakly reactive fractions. This inconvenience disappears when the glycoproteins are reduced and alkylated before fractionation on the immobilized lectin. In conclusion, the discovery of such lectin-weakly reactive glycoprotein fractions must be considered carefully.

Usually, immobilized lectin columns are eluted, after extensive washing with the equilibration buffer, with the same buffer but containing the haptenic monosaccharide (0.01–0.5 M). However, when glycoproteins differing in their lectin-reactive oligosaccharide residues are fractionated, it is interesting to elute the column with a concentration gradient of the haptenic sugar. Sometimes, the recovery of some bound glycoproteins is very low, even after elution with high concentration of haptenic sugar (0.5 M). This is the result either of a very high affinity of the lectin for some saccharidic determinants of the glycoproteins or of multivalent interactions between the immobilized lectin and a very high proportion of the saccharidic determinant on the glycoprotein. In the particular case of immobilized Con A, the recovery of high affinity glycoproteins can be improved by raising the temperature of the 0.5 M haptenic sugar solution to 37°C or even 60°C. Nevertheless, this procedure cannot generally be applied since most lectins are less efficient at 37°C than at room temperature (20°C) or 4°C.

The specific displacement of glycoprotein by haptenic sugar is reversible and after extensive washing with the equilibration buffer, the immobilized lectin can be used again with the same efficiency. However, stronger lectin–glycoprotein interactions can be displaced only with non-specific desorption processes which very often cause the irreversible denaturation of the immobilized lectin. Such non-specific displacements can be performed by pH change or with borate buffers of 0.02–0.1 M (pH 8.0), without denaturation of the lectin. High-yield recovery can also be obtained by heating the Con A–Sepharose–glycoprotein complex for 3 min at 100°C, in buffer containing 5% (w/v) sodium dodecyl sulphate and 8 M urea, but with irreversible inactivation of the lectin.

(iii) *Sequential affinity chromatography of glycoproteins on different immobilized lectins:* As is the case of oligosaccharides and glycopeptides (see below) the sequential use of chromatography on immobilized lectins, possessing different and well defined specificities toward saccharidic determinants, is used to fractionate complex mixtures

of glycoproteins into classes, depending on their affinity for the different lectins. Immobilized Con A and WGA are the most currently utilized.

4.3.2 Methods

Affinity chromatography of glycoproteins on immobilized Con A

- (i) Equilibrate the lectin column (Con A – Sepharose 4B, 30 cm × 2.0 cm i.d.) in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MnCl₂ at a flow rate of 9 ml/h at room temperature. Use 0.02% sodium azide in all buffers.
- (ii) Dissolve the glycoprotein mixture (30 – 50 mg) in 3 ml of the same buffer and centrifuge in order to remove any insoluble material.
- (iii) Apply the clear glycoprotein solution to the column and elute with the equilibration buffer until the effluent is free from protein. Monitor the effluent absorbance at 280 nm and collect 2-ml fractions. In certain cases, Con A-weakly reactive variants can be recovered as a retarded fraction by elution with the equilibration buffer.
- (iv) Remove the weakly retained glycoproteins with 0.01 M methyl α -D-glucoside in the equilibration buffer and the strongly Con A-reactive glycoproteins with 0.3 M methyl α -D-glucoside solution.
- (v) Regenerate the Con A-column by extensive washing with the equilibration buffer.
- (vi) Pool the separated glycoprotein fractions and extensively dialyse against distilled water before freeze-drying. When the exact capacity of the Con A-column is not known, the unretained fraction must be submitted to a new fractionation cycle on the regenerated column.

Affinity chromatography of glycoproteins on immobilized WGA

- (i) Purify the WGA from wheat germ by affinity chromatography on a column of 2-acetamido-*N*- ϵ -aminocaproyl-2-deoxy- β -glucopyranosylamine-Sepharose according to Lotan *et al.* (37). Couple the purified lectin to Sepharose 4B according to the procedure described above in order to obtain 5 mg immobilised WGA/ml of gel. Equilibrate the WGA-column (20 cm × 2.5 cm i.d.) in 0.01 M PBS (pH 7.2), containing 0.02% sodium azide, at a flow rate of 9 ml/h.
- (ii) Dissolve the glycoproteins (20 mg) in 3 ml of PBS and apply the clear glycoprotein solution to the column. Elute with PBS and monitor the effluent absorbance at 280 nm. As for Con A-affinity chromatography, WGA-weakly reactive glycoproteins can be recovered, as retarded fractions, by elution with the equilibration buffer.
- (iii) Elute the retained glycoproteins with 0.1 M *N*-acetylglucosamine in PBS. Pool the separated glycoprotein fractions and dialyse extensively against distilled water before freeze-drying.
- (iv) Regenerate the WGA column by extensive washing with PBS.

4.3.3 Limitations of lectin affinity chromatography for purification of glycoproteins

Affinity chromatography on immobilized lectins rarely succeeds in obtaining pure glycoproteins from complex mixtures. Generally, lectin affinity chromatography results in

an enrichment of classes of different heterogeneous glycoproteins, possessing similar carbohydrate determinants recognized by the immobilized lectin and called 'lectin receptors'. As different lectins are able to recognize different saccharidic sequences belonging to the same glycan class and as these glycans are likely to be common to numerous glycoproteins, the different lectins will react in fact with a broad spectrum of glycoproteins.

In addition, non-specific interactions between glycoproteins and lectins often restrict the use of immobilized lectins for the fractionation of glycoproteins.

4.4 Fractionation of glycopeptides and oligosaccharides

If purification and fractionation of glycoproteins present some limitations which restrict the use of the affinity chromatography on immobilized lectins for isolating glycoproteins, the procedure represents, in contrast, a powerful tool for the fractionation of glycopeptides and glycans. This is essentially due to the fact that the above mentioned non-specific interactions often observed between glycoproteins and lectins are very rare in the case of glycans and glycopeptides so that these compounds interact specifically with the lectins and can be fractionated on the basis of an 'actual' affinity chromatography. Consequently, this implies, even more than in glycoprotein fractionations, a very precise knowledge of the exact specificities of the lectins to be used. That is to say that, once the precise specificity of an immobilized lectin is well defined, it becomes possible to predict the primary structure of bound glycopeptides or oligosaccharides.

4.4.1 Affinity chromatography on immobilized Concanavalin A

- (i) Equilibrate the Con A-Sepharose column (10 cm × 1.0 cm i.d.) in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.2), containing 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ and 1 mM MgCl₂, at a flow rate of 9 ml/h at room temperature. Use 0.02% sodium azide in all buffers.
- (ii) Dissolve the glycopeptides (or the oligosaccharides) in 1 ml of equilibration buffer and apply the clear solution to the column.
- (iii) Elute (1.5 ml fractions) successively with five column volumes of equilibration buffer, then with three column volumes of 0.01 M methyl α-D-glucoside and finally with five column volumes of 0.3 M methyl α-D-glucoside.

In this way, oligosaccharides and glycopeptides are fractionated into three classes (Figure 13).

- (i) *Non-reactive glycopeptides (or oligosaccharides)*, eluted at the void volume of the column with the equilibration buffer.
- (ii) *Weakly reactive derivatives* obtained by eluting with the equilibration buffer itself. However, depending on the amount of immobilized Con A/ml of Sepharose, the same type of compounds can be weakly retained and may be eluted as a sharp peak with low concentration of the haptenic sugar derivative (0.01 M methyl α-D-glucoside).
- (iii) *Strongly reactive components*, eluted as a sharp or broad tailing peak with 0.3 M methyl α-D-glucoside, depending on the Con A concentration in the gel.

Purify the fractions from salts and haptenic sugar by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column (50 cm × 2 cm i.d.) equilibrated with distilled water. After elution with the

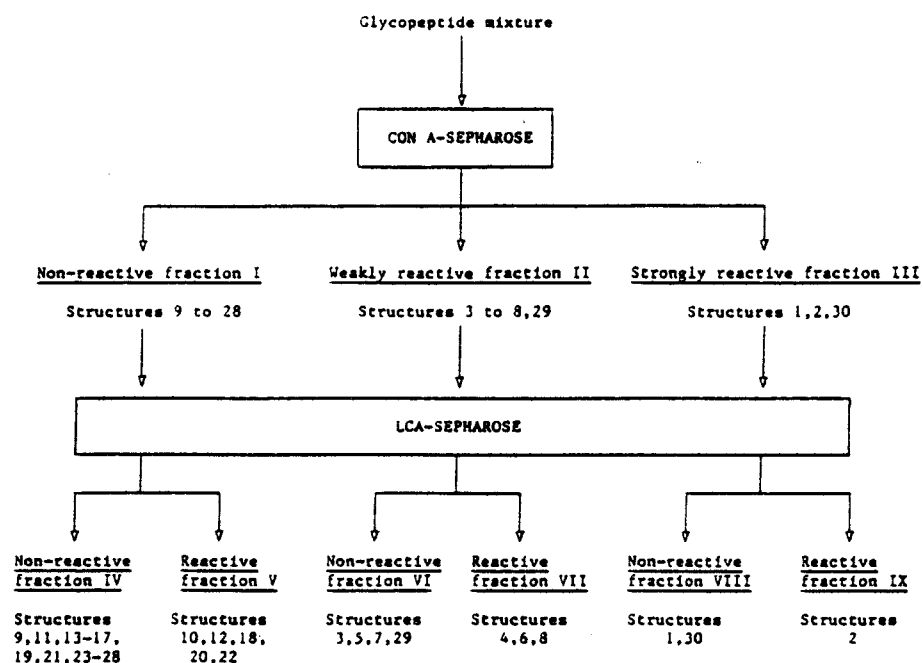


Figure 13. Scheme of fractionation of *N*-glycosylpeptides by combining affinity chromatography on immobilized ConA- and LCA-Sepharose. Arabic numerals refer to glycopeptide structures of Table 3.

last haptenic sugar solution, regenerate the Con A column by extensive washing with the equilibration buffer.

General comments

- The saccharidic structures (listed in Table 3) constituting each of the obtained fractions are described in Figure 13.
- Glycans released from glycosylpeptides, either by hydrazinolysis or by the action of various endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidases, present the same behaviour on immobilized Con A as glycopeptides.
- Sometimes, high affinity oligosaccharides are eluted from the column only by raising the temperature of the sugar solution to 60°C or by irreversible denaturation of the lectin with two column volumes of a 1% (w/v) solution of SDS. In such a case, the column cannot be re-used.
- Before using a new batch of immobilized Con A, calibration of the immobilized lectin with well-defined glycopeptides must be performed.
- Extensive use leads to a decrease of the binding capacity of Con A-Sepharose due to lectin leakage.
- When the exact binding capacity of the gel is not known, the unretained fraction must be recycled using the regenerated column. Commercially available Con A-Sepharose (Pharmacia) is able to bind 50–75 μ g of biantennary *N*-glycosylpeptides, obtained from human serotransferrin, per ml of gel.
- Before chromatography, glycopeptides can be 14 C- or 3 H-labelled by *N*-acetylation

according to the general procedure described above (see Section 2.2.2), by using labelled acetic anhydride. In the same way, oligosaccharides can be labelled by reducing the terminal monosaccharide residue with tritiated sodium borohydride by applying the general procedure of reduction and purification as described in Section 2.1.2.

4.4.2 Affinity chromatography on immobilized *Lens culinaris* agglutinin

LCA-Sepharose 4B can be purchased from different manufacturers or easily prepared from *Lens culinaris* seeds (38) and coupled to CNBr-activated Sepharose 4B, at a concentration of 5 mg of lectin/ml of gel.

- (i) Equilibrate the lectin column (15 cm × 2.5 cm i.d.) in PBS (pH 7.4) containing 0.02% sodium azide (divalent cations such as Ca²⁺ or Mn²⁺ are not required), at a flow rate of 9 ml/h at room temperature.
- (ii) Dissolve the glycopeptides in 1 ml of PBS and apply the clear solution to the column.
- (iii) Elute (1.5 ml fractions) the non-reactive glycopeptides (at the void volume) by passing five column volumes of PBS, and the lectin-reactive glycopeptides with five column volumes of PBS containing 0.15 M methyl α -D-glucoside. As for immobilized Con A, fractionation can be easily followed by labelling the glycopeptides by *N*-acetylation with [¹⁴C]- or [³H]acetic anhydride.
- (iv) Purify the fractions from salts and haptenic sugar by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column (50 cm × 2 cm i.d.) equilibrated with distilled water.
- (v) Regenerate the LCA column by extensive washing with PBS.

The following comments apply to this procedure:

- (a) The saccharidic structures consisting each of the fractions are described in *Figure 13*. From these results, it clearly appears that the α -1,6-linked fucose residue is determinant for the binding of glycopeptides and that affinity chromatography on immobilized LCA is a valuable tool for separating glycopeptides into two classes: α -1,6-fucosylated and non-fucosylated.
- (b) Only glycopeptides can be fractionated on immobilized LCA, not oligosaccharides. So, glycans released from *N*-glycosylpeptides by hydrazinolysis/*re-N*-acetylation or from *O*-glycopeptides by reductive β -elimination do not interact with immobilized LCA and are eluted in the void volume.
- (c) As in the above case, immobilized *Vicia faba* and *Pisum sativum* lectins interact only with fucosylated glycopeptides. However, their affinity is weaker, so that the fractionation into the two classes is achieved by using only the equilibration buffer.

4.4.3 Affinity chromatography on other lectins

Other immobilized lectins are also used, but to a lesser extent, for fractionating glycopeptides or oligosaccharides: PHA, WGA, RCA and DSA. In all cases, the general procedures are identical to that described for immobilized Con A and LCA. They differ only by the method of elution (*Table 4*).

The following general comments apply to this procedure:

Table 4. Composition of the equilibration and elution buffers and of the lectin-reactive fractions obtained.

Immobilized lectin	Mode of elution		Composition of the lectin-reactive fractions ^a
	Equilibration buffer	Elution buffer	
L ₄ -PHA ^b	PBS	PBS	17, 18, 21, 22
E ₄ -PHA ^c	PBS	PBS	9, 10, 27, 28
WGA	PBS	0.1 M GlcNAc in PBS	11, 29
RCA ₁	PBS	0.15 M Gal in PBS	5, 6, 13, 14, 17, 18, 21, 22
DSA	PBS	8 mg/ml of a mixture of <i>N,N'</i> -diacetylchitobiose and <i>N,N',N''</i> -triacetylchitobiose in PBS	25, 26

^aNumbers refer to the structures described in Table 3.

^b*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin.

^c*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinating lectin.

- (a) *N,N'*-diacetylchitobiose-Asn inner-core is an important determinant for binding to immobilized WGA and LCA, so that free glycans and oligosaccharides, devoid of the Asn residue, do not interact with the immobilized lectins. Substitution by an α -L-fucose residue at the C-6 position of the *N*-acetylglucosamine residue involved in the *N*-glycosylamine bond reduces the affinity of immobilized WGA for glycopeptides.
- (b) Immobilized WGA can also interact with glycopeptides possessing numerous clustered *O*-glycosidically linked sialyloligosaccharides.
- (c) Asialo, bi-, tri- and tetra-antennary glycans of the *N*-acetylglucosamine type can be fractionated on immobilized RCA₁. However, the separation depends upon the amount of bound RCA₁/ml of gel so that immobilized RCA₁ columns must be carefully calibrated with known glycopeptides before use.
- (d) Some lectins possess a specificity directed toward the terminal non-reducing sugars and are interesting tools for the fractionation of particular glycopeptides. For example, the immobilized A₄ tetrameric isolectin from *Griffonia simplicifolia* agglutinin I (GSA₁-A₄) presents a strict specificity toward *N*-acetyl- α -D-galactosamine in the terminal non-reducing position (39), while the immobilized B₄ tetrameric isolectin from *Griffonia simplicifolia* agglutinin I (GSA₁-B₄) is specific for glycopeptides with terminal non-reducing α -D-galactose residues (40). Another lectin (GSA₁₁), also isolated from the seeds of *Griffonia simplicifolia*, is a very useful tool for fractionating glycopeptides or oligosaccharides with *N*-acetyl- α -D-glucosamine residues in a terminal non-reducing position (41).
- (e) Two immobilized fucose-binding lectins [*Lotus tetragonolobus* (LTA) and *Ulex europaeus* (UEA₁) agglutinins] have no affinity for fucosylated glycopeptides or oligosaccharides of the *N*-acetylglucosamine type. Only the Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn glycopeptide is retained on both immobilized lectins and is eluted with 0.1 M L-fucose in PBS. However, a new fucose specific lectin, isolated from the mushroom *Aleuria aurantia*, seems to be a very promising tool for fractionating fucosylated glycopeptides and oligosaccharides (42).

4.4.4. Sequential affinity chromatography on immobilized lectins

Most of the *N*-glycosylpeptides can be fractionated into relatively homogeneous classes by sequential affinity chromatography (28,43). Up to now, the associations Con A- and LCA - Sepharose and of Con A-, LCA- and L₄-PHA - Sepharose are the most commonly utilized for fractionating the glycopeptides obtained from cell membrane glycoproteins.

This methodology is rapid and sensitive, particularly when glycopeptides are radiolabelled by using ¹⁴C- and/or ³H-labelled precursors or by *N*-acetylation carried out with [¹⁴C]acetic anhydride. Figure 13 presents the six classes of glycopeptides obtained by sequential affinity chromatography on immobilized Con A- and LCA - Sepharose and Figure 14 shows the results obtained by subfractionating fractions IV and V isolated by this procedure on immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin L₄-PHA.

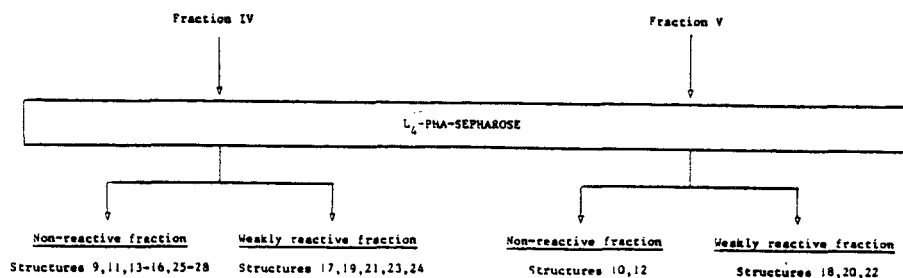


Figure 14. Scheme of subfractionation on immobilized L₄-PHA of *N*-glycosylpeptide fractions IV and V from Figure 13. Arabic numerals refer to glycopeptide structures of Table 3.

REFERENCES

24. Lis,H. and Sharon,N. (1977) in *The Antigens*, Sela,M. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 4, p. 429.
25. Goldstein,I.J. and Hayes,C.E. (1978) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **35**, 127.
26. Blake,D.A. and Goldstein,I.J. (1983) in *Methods In Enzymology*, Ginsburg,V. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 83, p. 127.
27. Lis,H. and Sharon,N. (1984) in *Biology of Carbohydrates*, Ginsburg,V. and Robbins,P. (eds.), J. Wiley, New York, p. 1.
28. Montreuil,J., Debray,H., Debeire,P. and Delannoy,P. (1983) in *Structural Carbohydrates in the Liver*, Popper,H., Reutter,W., Gudat,F. and Köttgen,E. (eds.), MTP Press, London, Falk Symposium, **34**, p. 239.
29. Kornfeld,R. and Ferres,C. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 2614.
30. Debray,H., Decout,D., Strecker,G., Spik,G. and Montreuil,J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, **117**, 41.
31. Debray,H., Pierce-Crétel,A., Spik,G. and Montreuil,J. (1983) in *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Bøg-Hansen,T.C. and Spengler,G.A. (eds.), De Gruyter, Berlin, Vol. 3, p. 335.
32. Murch,S.C., Parikh,I. and Cuatrecasas,P. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 149.
33. Wilchek,M. and Miron,T. (1974) *Mol. Cell. Biochem.*, **4**, 181.
34. Dulaney,J.T. (1979) *Mol. Cell. Biochem.*, **21**, 43.
35. Lotan,R. and Nicolson,G.L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.*, **559**, 329.
36. Bøg-Hansen,T.C. (1973) *Anal. Biochem.*, **56**, 480.
37. Lotan,R., Gussin,A.E.S., Lis,H. and Sharon,N. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 656.
38. Toyoshima,S., Osawa,T. and Tonomura,A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, **221**, 514.
39. Murphy,L.A. and Goldstein,I.J. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4739.
40. Eckhardt,A.E. and Goldstein,I.J. (1983) *Biochemistry*, **22**, 5290.
41. Shankar Yyer,P.N., Wilkinson,K.D. and Goldstein,I.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 330.
42. Yamashita,K., Kochibe,N., Ohkura,T., Veda,I. and Kobata,A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 4688.
43. Cummings,R.D. and Kornfeld,S. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 11235.

III. PROCÉDE GENERAL DE FRACTIONNEMENT ET D'ETUDE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES.

Sur la base des résultats obtenus lors de l'étude de la spécificité des lectines immobilisées, nous avons mis au point un schéma général de fractionnement des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires. Ce procédé, miniaturisé, permet de comparer des structures glycaniques obtenues à partir de 10^7 cellules seulement, après marquage métabolique des glycanes de ces cellules par incorporation de monosaccharides tritiés ou marqués au carbone 14 (L-fucose, mannose ou N-acétylglucosamine).

Ce procédé général de fractionnement est parfaitement applicable à n'importe quelle glycoprotéine de sécrétion obtenue en faible quantité. Les principales étapes de ce procédé sont les suivantes.

- A - Délipidation des membranes plasmiques ou des cellules entières selon le protocole de OLIVER et HEMMING [293].
- B - Hydrolyse pronasique exhaustive du matériel cellulaire délipidé.

Après délipidation, les protéines cellulaires sont digérées par la pronase selon la méthode de MURAMATSU et al. [294] dans un tampon Tris/HCl 0,14 M, pH 8,4, CaCl_2 14 mM.

L'hydrolyse est réalisée à 37°C pendant 72 h avec réaddition de pronase après 24 h et 48 h d'incubation. Après hydrolyse, l'excès de pronase est dénaturé en portant la préparation pendant 2 mn à 100°C. Les glycopeptides sont ensuite purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Bio-Gel P2 équilibrée dans l'eau.

C - Chromatographie de tamisage moléculaire des glycopeptides pronasiques.

Les glycopeptides pronasiques sont chromatographiés sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 (IBF, France) (1,6 x 100 cm) équilibrée dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,17 M. Cette chromatographie permet de séparer les protéoglycannes et les O-glycosylpeptides de poids moléculaire élevé - qui sont élués au volume mort de la colonne - des N-glycosylpeptides retardés, à l'étude desquels nous nous sommes plus particulièrement attachés. La figure n°2 (p.267) présente quelques profils d'élution caractéristiques obtenus par "gel-filtration" sur Ultrogel ACA 202.

D - Fractionnement des N-glycosylpeptides.

1 - A l'état natif, par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées.

Nous rappellerons simplement que la combinaison Concanavoline A/lectine de Lentille immobilisées nous permet d'obtenir huit familles de N-glycosylpeptides (Fig.2 ; p.166) dont les structures glycaniques de base sont parfaitement définies. Les conditions de fractionnement sur Con A et LCA immobilisées sont décrites dans la publication N°5, (p.155).

Chaque famille ainsi obtenue peut ensuite être sous-fractionnée à l'aide d'autres lectines immobilisées reconnaissant des motifs structuraux bien précis et dont nous avons également étudié les spécificités (lectines d'Erythrina, d'Aleuria aurantia, de Griffonia simplicifolia [GSA_I et GSA_{II}] ou de germe de Blé [WGA]) ou confirmé les spécificités démontrées dans d'autres laboratoires (lectines de Phaseolus vulgaris E_4 -PHA et L_4 -PHA (CUMMINGS et KORNFIELD [258]), WGA (GALLAGHER et al. [295]), IVATT et al. [296] ou lectine de Datura stramonium (DSA) (YAMASHITA et al. [297]).

Ainsi, à l'intérieur de chaque famille, la lectine de Griffonia simplicifolia_I (GSA_I) permet de séparer des glycopeptides possédant des résidus d' α -galactose ou d' α -N-acétylgalactosamine en position terminale non réductrice sur leur glycanne. De même, la lectine de

Griffonia simplicifolia_{II} (GSA_{II}) permet de séparer les glycopeptides possédant des résidus de N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice.

Les lectines d'Erythrina ou de Ricinus communis (RCA_I) réalisent le sous-fractionnement des asialoglycopeptides de type N-acétyllactosaminique.

La lectine d'Aleuria aurantia peut aider à résoudre le problème de la microhétérogénéité due à la présence de résidus de fucose liés en (α 1-6) ou en (α 1-3) sur les glycanes.

Enfin les lectines de germe de Blé (WGA) ou de Datura stramonium (DSA) permettent de sous-fractionner les glycopeptides de type poly-N-acétyllactosaminique.

On voit ainsi se dégager le fantastique pouvoir de résolution apporté par la technique de chromatographie d'affinité séquentielle sur diverses lectines immobilisées ayant chacune une spécificité très étroite.

2 - Fractionnement des glycanes par HPLC

D'autre part, les glycanes de chaque fraction glycopeptidique obtenue par chromatographie d'affinité séquentielle sont ensuite sous-fractionnés par HPLC d'échange d'ions sur Micropack AX10 qui sépare les glycanes en fonction du nombre de résidus d'acide sialique ou de sulfate ou par HPLC de partage sur colonne de phase reverse C₁₈ ou sur colonne Bondapack 5 μ . Cette dernière colonne permet, par exemple, de fractionner les glycanes de type oligomannosidique en fonction du nombre de résidus de mannose.

Cependant, avant d'envisager de fractionner par HPLC, il convient de se débarrasser de l'hétérogénéité liée à la partie peptidique et pour ce faire, libérer quantitativement les glycanes des N-glycosyl-peptides.

Ceci peut être réalisé de 3 façons différentes :

a - Méthodes de libération des glycanes des N-glycosyl peptides membranaires.

- Libération des glycanes par hydrazinolyse.

Nous rappellerons simplement que l'hydrazine anhydre permet la coupure sélective des liaisons amides (liaisons peptidiques, glycosylaminique et fonction acétamido) et esters en libérant, sous formes d'hydrazides, les acides dont le carboxyle était conjugué. Cette méthode a d'abord été appliquée à l'identification des acides aminés C-terminaux des protéines (AKABORI et al. [298]). Puis, son emploi a été étendu aux protéoglycanes et aux glycoprotéines (YOSIZAWA et al. [299] ; BAYARD et MONTREUIL [300]). Dans ce cas, l'hydrazine désacétyle les N-acétylglucosamines et libère les glycanes liés à la protéine par une liaison asparaginy-N-acétylglucosamine. La réacétylation des glycanes libérés peut être effectuée en présence d'anhydride acétique [^{14}C], ce qui permet de repérer plus facilement de faibles quantités d'oligosaccharides lors de fractionnements ultérieurs. On peut aussi réduire les glycanes libérés pour le borohydrure de potassium tritié.

Ce procédé quantitatif est applicable aux N-glycosylpeptides. Cependant, à cause des modifications que peut subir la N-acétylglucosamine liée à l'asparagine (MICHALSKI et al. [301]), une certaine hétérogénéité des glycanes ainsi libérés peut résulter de cette méthode de coupure.

Un protocole détaillé de la méthode d'hydrazinolyse/N-réacétylation appliquée à des glycopeptides membranaires est décrit à la page 242.

- Libération des glycanes par hydrolyse alcaline (méthode de LEE et SCOCCA [302]).

L'action de la soude 1 M en présence de borohydrure de potassium 1 M pendant 6 h à 100°C provoque la coupure des liaisons amides et, en particulier, de la liaison glycosylamine. Cependant, ce procédé de coupure appliquée à des N-glycosylpeptides membranaires dont les glycanes étaient radioactifs grâce à un marquage métabolique

préalable, se traduit par l'apparition de 10 à 25 % de composés micromoléculaires provenant de ces glycanes. Ceci démontre que cette méthode entraîne des dégradations non négligeables des glycanes au cours de leur libération.

- Libération des glycanes par action d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases spécifiques.

Différentes endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases sont à présent commercialisées. Ces enzymes coupent sélectivement la liaison (β 1-4) N-acétylglucosaminyl du résidu N,N'-diacétylchitobiose.

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H, isolée de Streptomyces plicatus, agit spécifiquement sur des glycopeptides de type oligomannosidique ou mixte. L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase F de Flavobacterium meningosepticum est active sur les glycopeptides de type oligomannosidique ou N-acétyllactosaminique, mais pas sur les glycopeptides de type mixte.

Nous avons utilisé l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H pour libérer quantitativement les glycanes de N-glycosylpeptides membranaires de type oligomannosidique (voir p.242).

- Libération des glycanes par action de peptide N⁴-(N-acétyl- β -D-glucosaminyl)asparagine amidases.

La commercialisation récente de diverses peptide-N-glycosidases et en particulier de la peptide N-glycopeptidase F de Flavobacterium meningosepticum (N-glycanase, Genzyme, Boston, USA), permet la libération des glycanes de N-glycosylpeptides de type N-acétyllactosaminique, mixte ou oligomannosidique.

Les premiers essais que nous avons effectués sur des glycopeptides membranaires avec la N-glycanase F sont très prometteurs et nous permettent d'obtenir des glycanes qui sont actuellement étudiés en ¹H-RMN.

Ainsi seraient résolus les problèmes posés par l'analyse en ^1H -RMN de fractions glycopeptidiques membranaires et liés à l'importance de la partie peptidique résiduelle ou à la présence de peptides hydrophobes adsorbés sur ces glycopeptides, causes possibles de la mauvaise qualité actuelle des analyses en spectroscopie RMN.

b - Fractionnement par HPLC, des glycanes libérés par ces différentes méthodes de coupure.

- Séparation en fonction de la charge.

Les glycanes libérés par hydrazinolyse ou par hydrolyse alcaline (méthode de LEE et SCOCCA) ont été fractionnés en fonction du nombre de résidus d'acide sialique par HPLC d'échange d'ions sur une colonne Micropack AX-10 (VARIAN) (0,4 x 25 cm) selon la méthode de BAENZIGER et NATOWICZ [303]. Cinq familles de glycanes sont ainsi obtenues : les glycanes neutres, mono-, di-, tri- et tétrasialylés.

Les conditions expérimentales de ce fractionnement sont détaillées à la page 243 et la figure 6 (p.271) présente un profil d'élution caractéristique de ce type de séparation.

- Séparation par HPLC de partage.

Les glycanes oligomannosidiques ont été fractionnés par HPLC sur une colonne Amino AS-5A, 5 μm (TOUZART et MATIGNON) (0,4 x 25 cm) selon la méthode de PAZ-PARENTE et al. [304]. Les conditions de cette séparation sont les suivantes : la colonne est équilibrée dans le solvant de départ acétonitrile/eau (60/40) et après injection de l'échantillon, le même solvant est utilisé pendant 20 mn suivi d'un gradient linéaire pendant 80 mn jusqu'au mélange acétonitrile/eau (45/55). Le débit est de 1 ml/mn et les fractions collectées sont de 0,5 ml.

E - Etude de la résonance magnétique nucléaire du proton des glycopeptides ou glycanes membranaires.

L'étude de la résonance magnétique nucléaire du proton des glycopeptides ou glycanes membranaires a été réalisée soit par

L'équipe du Professeur J.F.G. VLIEGENTHART (Utrecht, Pays-Bas), soit par J.M. WIERUSZESKI et G. STRECKER dans le cadre de l'Atelier de détermination de la structure primaire des glucides libres et conjugués créé dans notre laboratoire. L'analyse des oligosaccharides préalablement "échangés" par l'eau lourde a été effectuée sur un appareil BRUKER HX-360 à 360 MHz, sur un appareil BRUKER AM 400 W à 400 MHz ou sur un appareil BRUKER WM-500 à 500 MHz.

Les détails expérimentaux sont décrits dans les revues générales de VLIEGENTHART et al. [101, 104].

* *
* *

APPLICATIONS DU PROCEDE GENERAL DE FRACTIONNEMENT
A L'ETUDE DES MODIFICATIONS AFFECTANT LES GLYCANNES
DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES LORS DE LA
TRANSFORMATION MALIGNNE DES CELLULES ET DE LA
DIFFUSION METASTATIQUE

* *
* *

*
* *

I - STRUCTURES DES GLYCANNES DES MEMBRANES
PLASMIQUES DE FOIE DE RAT NORMAL ET HEPATOMATEUX

* *
*

INTRODUCTION

Pour des raisons de commodité et de rendement, nous avons choisi, pour mettre au point nos méthodes de fractionnement des glycanes membranaires, de travailler dans un premier temps sur les membranes plasmiques isolées de foie de Rat normal et hépatomateux.

L'approche méthodologique qui consistait à fractionner les glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A et lectine de Lentille immobilisées sur Sepharose 4B nous a permis de préparer 6 familles de glycopeptides membranaires.

Ces travaux font l'objet de la publication N°9 suivante, qui décrit la structure d'un glycanne majeur d'une de ces familles, isolé à partir de membranes plasmiques d'hépatocytes normaux.

Cependant, l'étude comparée des autres familles de glycopeptides préparés à partir de membranes plasmiques d'hépatocytes sains ou hépatomateux par ^1H -RMN ne nous a fourni, en raison du peu de glycanes dont nous disposions, que des données structurales fragmentaires, que nous avons cependant rassemblées dans le Tableau IX (p.233).

* * *

PUBLICATION N°9

STRUCTURE DETERMINATION BY 360-MHZ ¹H-NMR SPECTROSCOPY AND METHYLATION
ANALYSIS OF A BIANENNARY GLYCAN OF THE N-ACETYLLACTOSAMINIC TYPE
ISOLATED FROM RAT LIVER PLASMA MEMBRANE

EUR. J. BIOCHEM. (1981), 115, 559-563.

* * *

Pronase Digestion of Delipidated Membranes

The delipidated dry membranes (250 mg) were resuspended in 12 ml of distilled water and 2 ml of 1 M Tris/HCl pH 8.4. 0.1 M CaCl₂ was added. To prevent bacterial contamination, a few drops of toluene were added and the membranes were digested with 5 mg of pronase (B grade, Calbiochem) for 96 h at 37°C, a further 2.5 mg of pronase being added at 24 h and 48 h. The digest was then adjusted to pH 7 and centrifuged to remove insoluble materials.

Fractionation of Glycopeptides

The pronase digest was first chromatographed on a column (2 × 50 cm) of Sephadex G-25 fine eluted with 10 mM pyridine/acetic acid buffer pH 5.0. Glycopeptides were detected using the phenol/H₂SO₄ reagent [10]. Purified glycopeptides were *N*-[¹⁴C]acetylated on their peptide moiety with [¹⁴C]-acetic anhydride (7 Ci/mol) obtained from the Commissariat à l'Energie Atomique (France), according to Koide et al. [11]. The acetylated glycopeptides were desalted on a column (2 × 50 cm) of Sephadex G-25 fine equilibrated with 10 mM pyridine/acetic acid buffer pH 5.0, and then fractionated by affinity chromatography on a column (15 × 2.5 cm) of concanavalin-A – Sepharose 4B [12].

Methods

Molar ratios of neutral monosaccharides and hexosamines were determined after methanolysis by 0.5 M HCl/methanol, at 80°C during 24 h [13]. The amino acid composition of glycopeptides was determined with a Beckman Multichrom Analyser, hydrolysis of the glycopeptides being performed with 5.6 M HCl at 105°C under vacuum during 24 h.

Permethylation of glycopeptides was carried out according to Hakomori [14]. Partially methylated monosaccharides were identified according to Fournet et al. [15].

For NMR analysis, glycopeptides (750 µg) were repeatedly exchanged in deuterium oxide. The 360-MHz ¹H-NMR spectra of the glycopeptide solutions in 0.5 ml ²H₂O were recorded on a Bruker HX-360 spectrometer, operating in the Fourier transform mode, at probe temperatures of 20°C and 40°C. Chemical shifts are given relative to sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate (indirectly to acetone in ²H₂O : δ = 2.225 ppm).

RESULTS

Fractionation of Glycopeptides by Affinity Chromatography on Concanavalin-A – Sepharose 4B

From [¹⁴C]acetylated membrane glycopeptides chromatographed on a concanavalin-A – Sepharose 4B column, three fractions were obtained as shown in Fig. 1: (a) An unbound fraction (fraction 1) which might contain glycopeptides with *O*-glycosidic linkages and/or glycopeptides with the *N*-glycosylamine linkage, belonging to the *N*-acetylglucosamine type, with triantennary and/or tetraantennary structures according to the nomenclature of Montreuil [16]; (b) a retarded fraction (fraction 2) which presents a low affinity for concanavalin A and which is eluted with the buffer devoid of methyl α-D-glucoside; from previous experiments [12], it can be

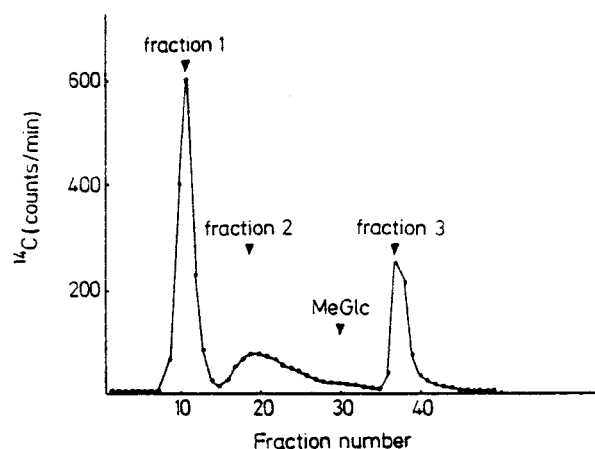


Fig. 1. Fractionation of glycopeptides by affinity chromatography on concanavalin-A – Sepharose 4B. MeGlc, position at which 0.2 M methyl α-D-glucoside was added to the elution buffer

predicted that the glycopeptides present in this fraction are biantennary glycopeptides of the *N*-acetylglucosamine type; (c) the third fraction (fraction 3) possesses a higher affinity for concanavalin A and is eluted from the column by 200 mM methyl α-D-glucoside. Preliminary methanolysis results show that these latter glycopeptides are mainly of the oligomannosidic type, with structures similar to those of ovalbumin or thyroglobulin type A glycopeptides [17,18]. However, the presence of *N*-acetylneuraminic acid and galactose residues seems to indicate that glycopeptides with oligomannosidyl-*N*-acetylglucosamine type (mixed type) structures [19] are probably present in this fraction or that the oligomannosidyl structures are contaminated with glycans of the *N*-acetylglucosamine type.

The fractions were rechromatographed on the same concanavalin-A – Sepharose column after desalting; each of them gives only one peak. This group separation of *N*-glycosidic glycopeptides by concanavalin-A – Sepharose 4B chromatography seems to be in good agreement with the results of Ogata et al. [20] and those of Krusius et al. [21] as well as with our own previous results [12]. Starting from 250 mg of delipidated dry membranes, the amount of total sugar recovered in each fraction after affinity chromatography on concanavalin-A – Sepharose is as follows: fraction 1, 3.84 mg; fraction 2, 750 µg; fraction 3, 460 µg. From these results, we can estimate the sugar in the membrane material to be 2% of the total. In this study, only results obtained with the retarded fraction (fraction 2) are presented. The unbound (fraction 1) and eluted fraction (fraction 3) are still under investigation.

Composition of the Glycopeptides of Fraction 2

Carbohydrate and amino acid compositions of the glycopeptides recovered in fraction 2 are shown in Table 1.

Structure Determination of the Glycopeptides of the Retarded Fraction (Fraction 2)

NMR-Analysis. The 360-MHz ¹H-NMR spectrum of fraction 2 is given in Fig. 2 and relevant NMR data are summarized in Table 2. The interpretation of the spectrum was carried out as described by Dorland et al. who took ad-

vantage of the corresponding spectra of appropriate reference compounds [22–24]. In this spectrum, the resonance positions of the mannose C-1 and C-2 protons show that this glycopeptide has the biantennary structure. The chemical shifts of the neuraminic acid C-3 protons indicate that the sialic acid residues are bound to C-6 of the galactose residues 6 and 6'. The fact that the C-1 protons of mannose 4 and 4' both shift downfield with respect to an asialo-biantennary glycopeptide [23] means that both branches are (α 2–6) sialylated. The resonance signals at 4.87 ppm (spectrum recorded at 40 °C), 4.11 ppm and 1.20 ppm point to the presence of a fucose residue linked (α 1–6) to the *N*-acetylglucosamine residue 1 [25]. The relative intensities of these signals indicate

Table 1. Molar composition in monosaccharides and amino acids of the glycopeptides of the retarded fraction (fraction 2)

Amino acid	Amount
	mol/mol Asp
Aspartic acid	1
Threonine	0.5
Serine	0.54
Glutamic acid	0.36
Glycine	0.47
Alanine	0.21
<hr/>	
Sugar	Amount
	mol/3 mol Man
Galactose	1.8
Mannose	3
Fucose	0.12
<i>N</i> -Acetylglucosamine	4.2
<i>N</i> -Acetylgalactosamine	0
<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	2.1

that a fucose analogue of the biantennary glycopeptide is present to about 10%. This agrees with the amount of fucose determined after methanolysis (Table 1). The ¹H-NMR spectral data of the major glycopeptide of fraction 2 are in

Table 2. ¹H-NMR chemical shifts of anomeric (C-1), mannose (C-2), *N*-acetylneuraminic acid (C-3) and *N*-acetyl protons for the major glycopeptide of the retarded fraction (fraction 2)

Proton	Chemical shift
	ppm
<i>Anomeric</i>	
GlcNAc 1	5.049
GlcNAc 2	≈ 4.62
Man 3	4.768*
Man 4	5.135
Man 4'	4.936*
GlcNAc 5	4.607
GlcNAc 5'	4.607
Gal 6	4.444
Gal 6'	4.444
<i>H-2</i>	
Man 3	4.256
Man 4	4.200
Man 4'	4.118
<i>H-3 equatorial</i>	
NeuAc	2.670
<i>H-3 axial</i>	
NeuAc	1.724
<i>N-acetyl</i>	
GlcNAc 1	2.010
GlcNAc 2	2.080
GlcNAc 5	2.069
GlcNAc 5'	2.069
NeuAc	2.030

* Values determined at 40 °C.

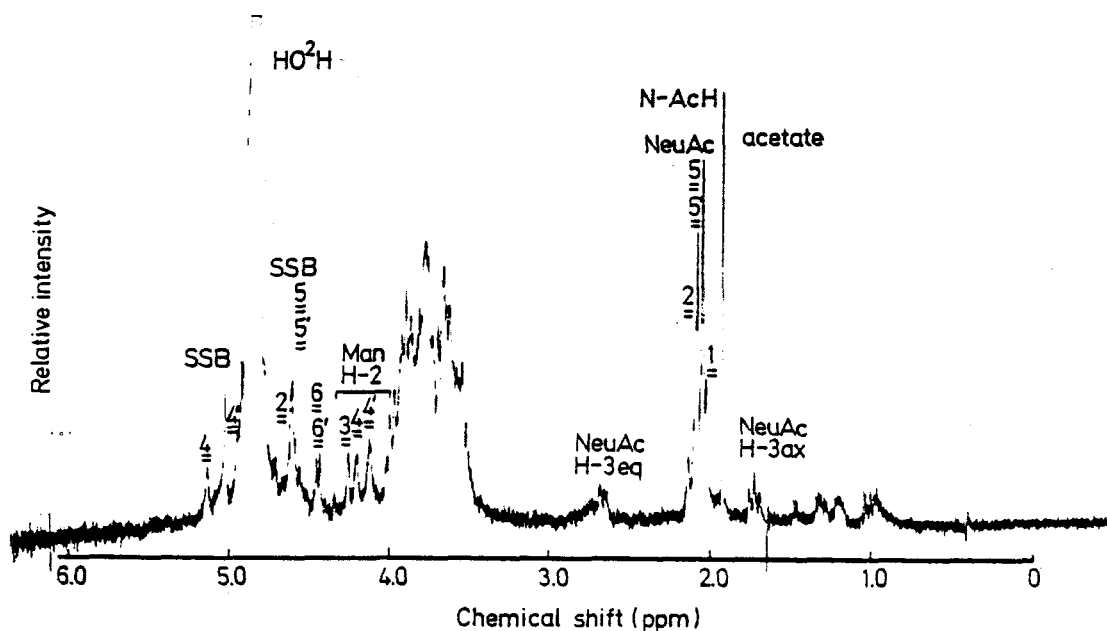


Fig. 2. 360-MHz: ¹H-NMR spectrum of the fraction 2 glycopeptides in 2H₂O at p²H 7. SSB = spinning side band; spectral width = 2500 Hz; data memory = 16 k; digital resolution = 0.3 Hz; acquisition time = 3.3 s; pulse angle = 90°; number of scans = 500

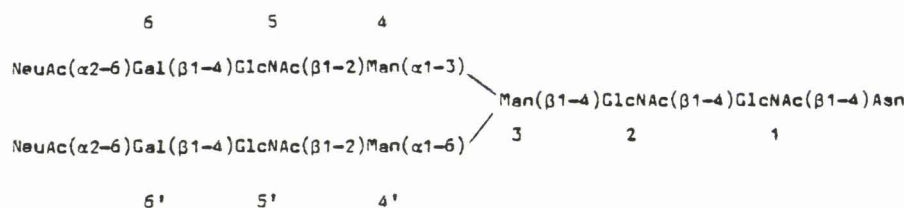


Fig. 3. Primary structure of one of the glycans isolated from rat liver plasma membrane

accordance with those of the sialoglycan structure of human [23] and rabbit [24] serotransferrin.

Permethylatation Studies. Analysis of methyl derivatives from constituting monosaccharides of glycopeptides of fraction 2 are in a good accordance with the NMR data. On the other hand, the nature and the molar ratio of monosaccharide methyl ethers agree with those reported earlier for the corresponding carbohydrate unit derived from human serotransferrin [26]: 3,4,6-tri-*O*-methylmannose : 2,3,4-tri-*O*-methylmannose : 2,4-di-*O*-methylmannose : 3,6-di-*O*-methylmannose = 1.95:1.7:1:3.7.

DISCUSSION AND CONCLUSION

On the basis of the carbohydrate composition, methylation analysis and 360-MHz ¹H-NMR spectroscopy, the primary structure of a glycan of a glycopeptide fraction isolated from rat liver plasma membrane as given in Fig. 3 was deduced.

Considering that we had available only 750 µg of glycopeptide, such a structure determination could be carried out only by the combination of high-resolution ¹N-NMR spectroscopy and methylation analysis which were for the first time applied to the study of glycans of plasma membrane origin. Thus it is demonstrated that NMR spectroscopy can be successfully used for structural studies of the carbohydrate moiety of membrane glycoproteins and that it is a very promising method. One of the particular advantages of this method is the fact that it is not destructive and thus leaves open the possibility of subsequent chemical and enzymic investigations.

Work is in progress concerning fractions 1 and 3 of normal rat liver plasma membranes and corresponding glycopeptidic fractions of hepatoma cells.

This kind of biantennary glycan structure of the *N*-acetyl-lactosaminic type has already been found in several glycoproteins: human [23] and rabbit [24] serotransferrins, human α₁-acid glycoprotein [27], thyroxin-binding globulin [28], Waldenström IgM J chain [29], bovine prothrombin [30], human plasminogen 1 [31] and rat α-lactalbumin [32].

Moreover, this structure has been recently characterized in calf thymocyte plasma membrane [33]. On the other hand, this structure seems to be widely distributed in glycoproteins originating from various sources and playing very different biological roles. The problem is thus posed of the biological specificity of this kind of common structure.

This work was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (L. A. 217: *Relations structure-fonction des constituants membranaires* and RCP 529: *Glucides et Glycoconjugués*; Director: Prof. J. Montreuil), by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (U 124: *Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses*; Director: Prof. G. Biserte); by the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique* (*Action concertée Cancérogénèse et Pharmacologie du Cancer*), Contract 79.7.

0669), by the *Fondation pour la Recherche Médicale*, the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the advancement of Pure Research (ZWO), grant UUKC OC 79-13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF). We are indebted to Mrs Monique Benaïssa and Mr Yves Leroy for their skilful technical assistance.

REFERENCES

- Hughes, R. L. (1975) *Essays Biochem.* 11, 1–36.
- Hakomori, S. I. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 417, 55–89.
- Warren, L., Buck, C. A. & Tuszinski, G. P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 516, 97–127.
- Montreuil, J. & Vliegthart, J. F. G. (1979) in *Glycoconjugate Research Proceedings of the Fourth International Symposium on Glycoconjugates* (Gregory, J. D. & Jeanloz, R. W., eds) vol. I, pp. 35–78, Academic Press, New York.
- Debray, H., Montreuil, J., Dorland, L. & Vliegthart, J. F. G. (1979) in *The Proceedings of the Fifth International Symposium on Glycoconjugates* (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M. F., Vliegthart, J. F. G. & Wiegandt, H., eds) p. 86, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Neville, D. M. (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 413–422.
- Ray, T. K. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 196, 1–9.
- Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rümke, P. H. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 126.
- Bonner, W. D. (1955) *Methods Enzymol.* 1, 722.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, K. J., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350.
- Koide, N. & Muramatsu, T. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4897–4904.
- Debray, H. & Montreuil, J. (1978) *Biochimie (Paris)* 60, 697–704.
- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291–301.
- Hakomori, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205–208.
- Fournet, B., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1974) *Actes Colloq. Int. no. 221, CNRS Glycoconjugués*, pp. 111–130, Centre National de la Recherche Scientifique ed., Paris.
- Montreuil, J. (1975) *Pure Appl. Chem.* 42, 431–477.
- Tai, T., Yamashita, K., Ito, S. & Kobata, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6687–6694.
- Ito, S., Yamashita, K., Spiro, R. G. & Kobata, A. (1977) *J. Biochem. (Tokyo)* 81, 1621–1631.
- Yamashita, K., Tachibana, Y. & Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3862–3869.
- Ogata, S., Muramatsu, T. & Kobata, A. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)* 78, 687–696.
- Krusius, T., Finne, J. & Rauvala, H. (1976) *FEBS Lett.* 71, 117–120.
- Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* 77, 15–20.
- Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Strecker, G., Michalski, J.-C., Fournet, B., Spik, G. & Montreuil, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 323–329.
- Leger, D., Tordera, V., Spik, G., Dorland, L., Haverkamp, J. & Vliegthart, J. F. G. (1978) *FEBS Lett.* 93, 255–260.
- Schutt, B. L., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G. & Fournet, B. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 1223–1228.

26. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* 50, 296–299.
27. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206–5214.
28. Zinn, A. B., Marshall, J. S. & Carlson, D. M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6768–6773.
29. Baenziger, J. U. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4063–4071.
30. Mizuochi, T., Yamashita, K., Fujikawa, K., Kisiel, W. & Kobata, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6419–6425.
31. Hayes, M. L. & Castellino, F. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8772–8776.
32. Prasad, R., Hudson, B. G., Strickland, D. K. & Ebner, K. E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1248–1251.
33. Yoshima, H., Takasaki, S. & Kobata, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10793–10804.

H. Debray, B. Fournet, and J. Montreuil, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Boite postale 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

L. Dorland and J. F. G. Vliegthart, Organisch-Chemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit te Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522-AD Utrecht, The Netherlands

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans l'étude des glycanes des membranes plasmiques de foie de rat normal et hépatomateux démontrent, d'une part, l'efficacité de la méthode de fractionnement par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées et, d'autre part, l'efficacité de la méthode de détermination des structures primaires des glycanes membranaires par $^1\text{H-RMN}$.

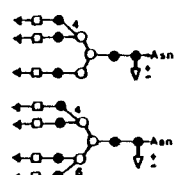
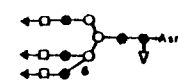
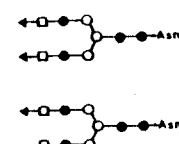
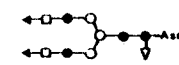
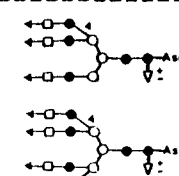
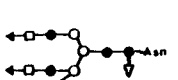
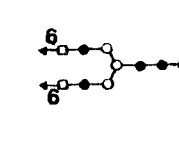
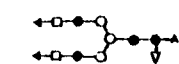
La structure du glycanne majeur d'un glycopeptide isolé à partir de membranes plasmiques d'hépatocytes normaux est, à ce titre, la première structure de glycanne membranaire ayant été déterminée par ce procédé.

D'autre part, bien que l'étude comparée par $^1\text{H-RMN}$ des autres familles de glycopeptides membranaires préparés à partir de membranes d'hépatocytes sains ou hépatomateux ne nous ait fourni que des données structurales fragmentaires, rassemblées dans le Tableau IX (p.233) en raison du peu de glycanes dont nous disposions, nous constatons que les membranes plasmiques de foie hépatomateux renferment plus de glycanes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés (75 %) que les membranes plasmiques de foie sain (70 %). Au contraire, les membranes plasmiques de tissu cancéreux ne renferment que 15 % de glycanes de type N-acétyllactosaminique biantenné contre 19 % dans les membranes plasmiques de foie sain. Aucune modification significative n'est constatée au niveau des glycanes membranaires de type oligomannosidique (10 % dans le tissu hépatomateux contre 11 % dans le tissu normal).

Malgré ses lacunes, ce travail nous permet donc de mettre en évidence, dans un hépatome chimio-induit, une altération structurale des glycanes membranaires se traduisant par un enrichissement notable en glycanes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés au détriment des glycanes biantennés.

TABLEAU IX

Répartition (en pour cent de la radioactivité totale) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonnes de ConA et de LCA immobilisées des glycopeptides pronasiques préparés à partir de membranes plasmiques de foie de Rat sain et hépatomateux et données structurales obtenues sur chacune des fractions par ¹H-RMN à 360 MHz. (●)GlcNAc ; (○)Man ; (□)Gal ; (▼)NeuAc ; (▽)Fuc.

Fractions	FNR-C FNR-L	FNR-C FE-L	FE-C 0,01M FNR-L	FE-C 0,01M FE-L	FE-C 0,3M FNR-L	FE-C 0,3M FE-L
%	66,90	3,30	14	4,35	10,50	0,95
Membranes plasmiques de foie sain	 <p>- Glycannes sialylés en α2-6 ou en α2-3</p> <p>- Pas de glycannes biantennés renfermant des résidus de β-GlcNAc intercalaires</p>	 <p>- Glycane majeur</p> <p>- Pas de glycannes biantennés renfermant des résidus de β-GlcNAc intercalaires</p>	 <p>Glycannes majeurs (80 à 90 %)</p> <p>- Existence de glycannes sialylés en α2-3 mineurs</p>	 <p>- Rapport de sialylation $\frac{\alpha 2-3}{\alpha 2-6} = 1$</p>	<p>- Glycannes de type oligomannosidique renfermant essentiellement des structures à 9 résidus de mannose</p>	ND
Membranes plasmiques de foie hépatomateux	 <p>- Glycannes sialylés en α2-6 ou en α2-3</p> <p>- Pas de glycannes biantennés renfermant des résidus de β-GlcNAc intercalaires</p>	 <p>- Glycane majeur renfermant plus d'acides sialiques liés en α2-6 qu'en α2-3</p> <p>- Pas de glycannes biantennés renfermant des résidus de β-GlcNAc intercalaires</p>	 <p>Glycane majeur</p> <p>Glycane mineur</p>	 <p>- Rapport de sialylation $\frac{\alpha 2-3}{\alpha 2-6} = \frac{1}{2}$</p>	<p>- Glycannes de type oligomannosidique renfermant essentiellement des structures à 9 résidus de mannose</p>	ND
%	68,35	6,20	6,10	9,15	8,90	1,30

* *
* *

II - ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES
MEMBRANAIRES DE FIBROBLASTES DE REIN DE HAMSTER NORMAUX
(BHK 21/C13/8) ET TRANSFORMES PAR LE VIRUS DU
SARCOME DU HAMSTER (BHK 21/C13/8/HS5)

* *
* *

INTRODUCTION

Afin de nous permettre de vérifier si la transformation maligne d'une cellule s'accompagnait bien d'altérations structurales de leurs glycanes, nous avons choisi comme modèle cellulaire le fibroblaste de rein de Hamster (cellules BHK 21/C13, sous-clone 8) comme cellule "normale" de référence et le même fibroblaste infecté par le virus du sarcome du Hamster (BHK 21/C13/8/HS5) comme cellule transformée.

Ces cellules, dont les diverses propriétés biologiques sont parfaitement définies, nous ont été aimablement fournies par le Professeur L. MONTAGNIER de l'Institut Pasteur de Paris, que nous tenons à remercier ici. Une des raisons de notre choix est constituée par la relative facilité avec laquelle ces cellules peuvent être cultivées. Nous tenons également à remercier Madame M. CONIEZ qui a cultivé et nous a fourni ces cellules.

A) Etude comparée des glycanes membranaires totaux

En appliquant le schéma de fractionnement décrit précédemment, nous avons étudié :

1 - Les structures glycaniques de glycopeptides membranaires libérés par action ménagée de la trypsine sur les cellules entières de façon à comparer nos résultats avec ceux obtenus par le groupe de WARREN (voir p.70).

2 - Nous avons ensuite comparé les glycopeptides cellulaires résiduels après action ménagée de la trypsine.

3 - Nous avons également comparé les glycopeptides cellulaires totaux, sans action préalable de la trypsine sur les cellules. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la publication N°10.

* *
* *

PUBLICATION N°10

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOPEPTIDES FROM NORMAL AND VIRUS-
TRANSFORMED BABY HAMSTER KIDNEY FIBROBLASTS.

GLYCOCONJUGATE J. (1987) (SUBMITTED FOR PUBLICATION).

* *
* *

Isolation and characterization of glycopeptides from normal and
Virus-transformed Baby Hamster Kidney fibroblasts.

Henri DEBRAY, Philippe DELANNOY, Philippe DEBEIRE and Jean MONTREUIL.

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

Running title : Glycans of transformed cells.

Adress to which proofs should be sent :

Henri DEBRAY, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Subdivision : malignant phenotype, cell glycans.

Address of the authors :

Henri DEBRAY*, Philippe DELANNOY, Philippe DEBEIRE and Jean
MONTREUIL. Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois,
Laboratoire de Chimie Biologique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex.

* to whom correspondance should be addressed.

Abreviations.

BHK fibroblasts : Baby hamster kidney fibroblasts, strain BHK21/C13 ;
HSV/BHK fibroblasts : BHK 21/C13 fibroblasts transformed by B 34 strain
of Hamster sarcoma virus ; Con A : Canavalia ensiformis agglutinin ; LCA :
Lens culinaris agglutinin ; HPLC : High performance liquid chromatography ;
NaCl/P_i : 0.01 M sodium phosphate - 0.14M sodium chloride, pH 7.2 buffer ;
TBS : 0.02M Tris/Hcl - 0.15M sodium chloride, pH 7.5 buffer ; α MG :
 α -methyl-D-glucoside ; ATFA : trifluoroacetic acid ; T.L.C : thin layer
chromatography ; GlcNAc : N-acetyl-D-glucosamine ; FNR-C : Fraction
non-retained on a Con A-Sepharose column ; FE-C 0.01M : Fraction eluted
from a Con A-Sepharose column by 0.01M α MG ; FE-C 0.3M : Fraction eluted
from a Con A-Sepharose column by 0.3M α MG ; FNR-C FNR-L : Fraction
non-retained on Con A and LCA-Sepharose columns ; FNR-C FE-L : Fraction
non-retained on Con A-Sepharose and retained on LCA-Sepharose ; FE-C 0.01M
FNR-L : Fraction eluted from Con A-Sepharose and non-retained on
LCA-Sepharose ; FE-C 0.01M FE-L : Fraction eluted from Con A-Sepharose with
0.01M α MG and retained on LCA-Sepharose ; FE-C 0.3 M FNR-L : Fraction
eluted from Con A with 0.3M α MG and non-retained on LCA-Sepharose ; FE-L
0.3M FE-L : Fraction eluted from Con A-Sepharose with 0.3M α MG and retained
on LCA-Sepharose ; EMEM : Modified Eagle's minimum essential medium ;
TPCK-Trypsin : trypsin treated with L-(tosylamido 2-phenyl)
ethylchloromethyl ketone, to inhibit contaminant chymotryptic activity.

Summary

Radiolabeled glycopeptides, from early passages of Baby Hamster kidney fibroblasts (BHK) and from its virally transformed subline HSV/BHK, obtained by mild trypsin treatment followed by pronase digestion, and glycopeptides obtained from the remaining cell pellets or from whole cells were cofractionated by associating gel-filtration and affinity chromatography on immobilized lectins. The following results were obtained :

1 - The glycopeptides were divided into 4 families (I to IV) by gel filtration on Ultrogel ACA 202. Transformed cells contained more larger size glycopeptides than the control cells, as has been already demonstrated by several authors (2,4,8,26). This increase was considerably amplified in cell surface glycopeptides, obtained by trypsin treatment.

2 - Glycopeptides from peak II, III and IV were separately or after pooling, co-fractionated according to their affinity toward Con A- and LCA-Sepharose. Glycopeptides from families I and II did not possess any affinity for the lectins. Family III appeared as a mixture of glycopeptides with or without affinity either for Con A or LCA. Glycopeptides from family IV, possessing high affinity for Con A, were of the oligomannosidic type.

3 - Each glycopeptide family was also subjected to hydrazinolysis-N-reacetylation and the liberated glycans were fractionated according to their charges by ion-exchange HPLC.

The obtained results confirmed and extended previous data (2,8,26), showing that the main biochemical differences between normal and transformed cells concerned the glycans of the N-acetylactosaminic type and that the increase in tri- and tetraantennary glycans, mainly observed in cell surface glycopeptides from transformed cells, but also in total cellular glycopeptides, is really associated with malignant transformation.

According to several authors (1-5), one of the permanent cell surface modification associated with the malignant cell phenotype is the appearance or the increase in amount of high molecular weight sugar materials. These alterations were also found in various subcellular fractions obtained from transformed cells (6). On the basis of the weak interaction of "fast-eluting" glycopeptides with immobilized Con A, Ogata et al. (7) suggested that they contained glycans of the N-acetyllactosaminic type, at least tri- and tetraantennary. Later, Takasaki et al. (8), on the basis of the electrophoretic mobility of the glycans liberated from transformed cell glycopeptides by hydrazinolysis, suggested that the transformation led to a relative decrease in biantennary glycans with a concomitant increase in tetraantennary glycans.

In the present study, we developed a scheme of fractionation of cellular glycopeptides combining gel filtration, sequential affinity chromatography on immobilized Con A and Lens culinaris agglutinin and ion-exchange HPLC. Differences between normal and transformed cells are not qualitative, but quantitative : the transformed cells are enriched into highly branched glycans of the N-acetyllactosamine type, suggesting misregulation of some N-acetylglucosaminyltransferases involved in the formation of additional antennae leading to tri- and tetraantennary glycans.

Materials and Methods

Materials.

D-[1-¹⁴C] glucosamine hydrochloride (55 mCi/mmol), D- [6-³H] glucosamine hydrochloride (34 Ci/mmol), L- [1-¹⁴C] fucose (57 mCi/mmol),

L- [6-³H] fucose (20 Ci/mmol), D- [2-³H] mannose (15 Ci/mmol) and sodium [³⁵S] sulphate (56 mCi/mmol) were obtained from the Radiochemical Center (Amersham France). Pronase (grade B) was purchased from Calbiochem (La Jolla, U.S.A.). Endo-β-N-acetylglucosaminidase H from Streptomyces griseus was from Miles France, TPCK-trypsin from Worthington Biochemical Corp. and Soybean trypsin inhibitor from Sigma. Ultrogel ACA 202 was supplied by IBF, France, aqualyte liquid scintillation cocktail, from J.T. Baker Chemicals, Holland ; hydrazine from Pierce, Rockford, U.S.A. ; Con A-Sepharose from Pharmacia, France and Biogel P2 (200-400 mesh) from Biorad. Lens culinaris agglutinin has been purified by affinity chromatography and coupled to Sepharose 4B at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel as described (9).

Cell culture.

The permanent line of Baby Hamster fibroblasts (BHK 21) was established by Mac Pherson and Stoker in 1962 from kidney cultures of a newborn hamster (10). These cells, with a low number of culture passages (at 16 passages level) are described as an intermediate between "normal" cells from primary or secondary cultures and transformed cells (11). HSV/BHK fibroblasts are BHK 21/C13 fibroblasts (subclone C13/8) transformed by B34 strain of Hamster Sarcoma Virus, and represent well characterized transformed cells (12).

BHK (16 passages) fibroblasts (control cells) and HSV/BHK fibroblasts (transformed cells) were obtained from Dr. L. MONTAGNIER (Institut Pasteur, Paris). These cells were grown in modified Eagle's MEM (EMEM) as described (10).

Radioactive labeling of cells.

BHK cells (Passages 16 to 19) or HSV/BHK cells, seeded in 150 cm² Falcon plastic flasks in 40 ml of medium, were grown for 48 h either with 125 µCi of [³H] sugar precursors or 5µCi of L-[1-¹⁴] fucose or 25µCi of D-[1-¹⁴C] glucosamine hydrochloride.

After labeling, the medium was removed and the cells were washed three times with either NaCl/Pi or TBS. They were then treated with TPCK-trypsin or scraped off with a rubber policeman and centrifuged (1500 g, 5 mn).

For labeling of proteoglycans, cells were grown for 48 h in 40 ml of medium containing 125 µCi of D-[6-³H] glucosamine hydrochloride and 300 µCi of ³⁵S04.

Preparation of total cellular glycopeptides.

Cell pellets were first delipidated according to the procedure of OLIVER and HEMMING (13). Delipidated material was digested for 72 h with pronase according to MURAMATSU et al. (14). Up to this point, cellular materials from control and transformed fibroblasts were treated separately. Then, for the following analysis, glycopeptides from both cell types were mixed and co-fractionated.

Preparation of cell surface-associated materials (trypsinates).

After labeling, the medium was removed and cells were washed three times with TBS, according to Glick (15). Cells were then incubated with 10 ml of 0.03% TPCK-trypsin in TBS for 10 mn at room temperature. To terminate the digestion, 10 ml of 0.05 % soybean trypsin inhibitor in TBS were added. The cells were collected by centrifugation at low speed and

the supernatant material (Trypsinate) was desalted on a Biogel P2 column (60 x 2,5 cm) equilibrated with water.

Desalted trypsinates from both cell types were then mixed and digested for 72 h with pronase.

The remaining cell pellets were treated as described above for the preparation of total cellular glycopeptides.

Gel filtration on Ultrogel ACA 202.

Mixture of glycopeptides from control and transformed fibroblasts was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and diluted with 1 ml of elution buffer (0.01M Tris/Hcl pH7.4, 0.17 M Nacl). The material was chromatographed on a column (100 x 1.6 cm) of Ultrogel ACA 202. Fractions of 1.5 ml were collected and aliquots were counted for radioactivity, using 4 ml of Aqualyte liquid scintillation cocktail. The ^3H - and ^{14}C - radioactivity of each fraction was differentially counted in a Beckman LS-9000 scintillation counter and the elution profiles were drawn by plotting ^3H - and ^{14}C - radioactivity as percentages of total radioactivity eluted from the column.

Affinity chromatography of glycopeptides on Con A-Sepharose and LCA-Sepharose.

Glycopeptides were first applied on a column of Con A-Sepharose (10 x 1 cm) equilibrated with 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.2, containing 0.1M Nacl and 1mM of MgCl_2 , Nacl, CaCl_2 . Elution was carried out first with the above buffer and then with the buffer containing 0.01M αMG and finally, with the same buffer containing 0.3M αMG .

After counting, selected fractions were pooled and desalted on a Biogel P2 column (60 x 2.5 cm) equilibrated with water.

Desalted fractions were then concentrated and applied on a column of LCA-Sepharose (10 x 1 cm) equilibrated with NaCl/P₁, pH 7.2 buffer. Elution was carried out first with the above buffer and then with the same buffer plus 0.15M αMG.

Both affinity chromatographies were carried out at room temperature and at a flow rate of 10ml/h. 1.5 ml fractions were collected and aliquots counted by liquid scintillation as described above.

Enzymatic release of the oligomannosidic type glycans from N-glycosylpeptides

for treatment with endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase H (endo H), desalted glycopeptides were dissolved in 0.2 ml of 0.05M sodium phosphate-citrate buffer pH 5.0. After addition of 10 mU of endo H, the mixture was incubated at 37°C for 24 h in a toluene atmosphere.

Hydrazinolysis of glycopeptides.

500 μl of anhydrous hydrazine were added to glycopeptides freeze-dried in a methanolysis tube. Sealed tubes were heated at 105°C for 20 h (16). After cooling, hydrazine was evaporated under a stream of nitrogen and residual hydrazine was further evaporated three times with toluene under nitrogen. The residue was dried under vacuum over concentrated H₂SO₄, for 24 h. Glycans were dissolved in 500 μl of a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and N-reacetylated at room temperature by 3 successive additions of 10 μl of acetic anhydrid. After each addition, the pH was readjusted to 8-9 with solid NaHCO₃. N-reacetylated glycans were then desalted on a Biogel P2 column equilibrated with water.

Alkaline borohydride treatment of glycopeptides.

The material eluted at the void volume of the Ultrogel ACA 202 column was subjected to alkaline borohydride treatment according to CARLSON (17) in order to release the glycans O-glycosidically linked to β -hydroxy-amino acids. The sample was dissolved in 1ml of 0.05 N NaOH/1M NaBH₄ and incubated at 45°C for 15 h. At the end of the incubation, excess of NaBH₄ was destroyed by addition of 1M acetic acid until the pH was adjusted to 5.0. The solution was applied on the ACA 202 column and the liberated glycans were further characterized by TLC analysis on silica gel plates with n-butanol/acetic acid/water (2/1/1 by vol.) as a solvent. Monosialyl- and disialylgalactosyl(β 1-3) N-acetylgalactosaminitol liberated by reductive β -elimination from bovine fetuin were used as standards and visualized with an orcinol/sulfuric acid reagent (18). The liberated radioactive glycans were localized by counting 0.5 cm strips removed of the silica gel plates.

High performance liquid chromatography of hydrazinolysis-released glycans.

Fractionation of glycans into sialylated and nonsialylated families was performed by applying a modification of the procedure of BAENZIGER and NATOWICZ (19). Equipment used was a Spectraphysic liquid chromatograph (model SP 8700), with a Micropak AX-10 column (30 x 0.4 cm), (Varian Associates). Samples were injected in 50 μ l of water and elution was carried out, at a flow rate of 1 ml/min, with water for 10 min followed first by an increasing linear gradient of KPO₄H₂, pH 4.0 from 0 to 25 mM in 10min, then by a 5min plateau at this concentration ; a linear gradient of KPO₄H₂ pH 4.0 from 25mM up to 100mM in 30min was applied followed by a linear increase of the phosphate concentration up to 400mM in 20min.

Fractions of 0.64 ml were collected directly into minivials used for liquid scintillation counting and counted as above described.

Characterization of radioactive sugars in labeled glycopeptides.

Hydrolysis of glycopeptides was performed with 4N trifluoroacetic acid (100°C;4 h) for neutral sugar and hexosamines and with 0.1 N trifluoroacetic acid (80°C ; 30 mn) for sialic acids. The liberated monosaccharides were separated and located as described (20)

Fig 1 summarizes the general scheme of fractionation used to analyse glycopeptides and glycans from N-glycosylproteins of control and Virus-transformed fibroblasts.

RESULTS

Gel filtration on Ultrogel ACA 202 of cellular glycopeptides.

1 - Analysis of D-glucosamine labeled glycopeptides.

Four fractions (I to IV) are obtained by gel filtration on Ultrogel ACA 202 of either glycopeptides from the cell surface (Fig 2A), from the remaining cell pellets after action of trypsin (Fig 2B) and from whole cells (Fig 2C).

The elution profile from cell surface glycopeptides (Fig 2A) is simpler than those obtained from remaining cell glycopeptides or with total cell glycopeptides and shows the absence of Peak I and a poorly defined peak IV.

In each elution profile, glycopeptides from transformed cells are enriched in higher molecular weight glycopeptides (Peak II) with an average molecular weight of 4.500, as compared with control cells as previously described (2-4).

This increase is significantly amplified in cell surface glycopeptides obtained by trypsin treatment, where the "rastly eluting" glycopeptides represent 48.20 % of the total radioactivity for only 19.20 % for the cell surface glycopeptides from control fibroblasts (Table 1).

On the contrary, transformed fibroblasts contain less glycopeptides eluted from the Ultrogel ACA 202 column as biantennary type glycopeptides (peak III) than the control cells (31.50 % versus 57.20 %), when cell surface glycopeptides were analysed. Peak IV represents mainly oligomannosidic type glycopeptides. This was confirmed by endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H digestion. The enzyme acts specifically on oligomannosidic type glycopeptides and has liberated quantitatively oligomannosidic type glycans from the D-glucosamine labeled

glycopeptides of peak IV.

After incorporation of $^{35}\text{S}\text{O}_4$ and analysis of the ^{35}S -labeled total cellular glycopeptides on Ultrogel ACA 202, ^{35}S -associated radioactivity is eluted only at the void volume of the column (peak I). This result, considered together with the results of the analysis of the labeled sugars found in peak I (D-glucosamine, D-galactosamine and sialic acid), suggests that the material eluted at the void volume contains proteoglycans and large glycopeptides with O-glycosidically linked glycans. Two glycans have been liberated from peak I by reductive β -elimination and separated by T.L.C. on silica gel plates. They migrate as monosialyl- and disialylgalactosyl (β 1-3) N-acetylgalactosaminitol, liberated by reductive β -elimination from bovine fetuin. As suggested by BHAVANANDAN and DAVIDSON (21), several O-glycosidically-linked glycans could be present in clusters on the peptidic backbone, protecting it from the action of proteolytic enzymes and this can explain their apparent high molecular weight.

After D-glucosamine labeling, the glycans released by β -elimination represents 15 % of peak I radioactivity in control fibroblasts, but 27 % in transformed fibroblasts. If the monosialylated glycan represents 81 % of the liberated glycans in transformed fibroblasts, it represents only 66.6 % in control cells. Our results confirm those of OHKUBO et al (22) suggesting that the difference between control and transformed BHK cells with respect to O-glycosidically linked glycans present in peak I is quantitative.

The material resistant to reductive β -elimination cleavage may represent large glycans released from proteoglycans, which have not been further characterized. However, after D-glucosamine labeling, some N-glycosidically linked glycans can be released from this material by hydrazinolysis/N-reacetylation and fractionated by ion-exchange HPLC. Such glycans can represent sialylated triantennary N-glycosidically linked

glycans, which have been characterized in keratan sulfate (23).

2 - L-fucose labeled glycopeptides.

After L-fucose labeling, the elution profile of the cofractionated total cellular glycopeptides from normal and transformed fibroblasts is greatly simplified (Fig. 3).

Very small amounts of radioactivity are found associated with peaks I and IV. Moreover, the increase of high molecular weight glycopeptides in transformed fibroblasts, associated with a concomitant decrease in lower molecular weight glycopeptides, is amplified when compared to the D-glucosamine labeling experiment.

The obtained results confirm also the proteoglycan nature of peak I as well as the oligomannosidic type structure of the glycopeptides associated with peak IV, which are non-fucosylated structures.

3 - D-Mannose[2-³H]labeled glycopeptides.

After D-mannose[2-³H]labeling, the elution profiles of total cellular glycopeptides from control and transformed fibroblasts were performed separately, but are presented here in the same figure (Fig. 4).

Acid hydrolysis (ATFA 0.1N, 80°C, 30 mn and ATFA 4N, 4 h, 100°C) and analysis of the released labeled sugars by paper chromatography revealed that the only recovered radioactivity was associated with D-mannose.

A low amount of radioactivity is associated with peak I and could be associated with N-glycosically linked glycans as those found in keratan sulfate.

The bulk of the total radioactivity is recovered in peak IV, confirming the oligomannosidic nature of the glycopeptides. Endo-N-acetyl-

-D-glucosaminidase H digestion quantitatively liberated oligomannosidic glycans from peak IV glycopeptides.

However, peak IV appears more heterogeneous and enriched into higher molecular weight glycopeptides in the case of transformed fibroblasts. Analysis of oligomannosidic glycopeptides from both control and transformed fibroblasts is now in progress to determine if the observed misregulation of branching of the N-acetylglucosaminic type glycans was not a consequence of modifications in the processing of the oligomannosidic glycans.

However, after D-mannose-[2-³H]labeling, a fraction enriched in high molecular weight glycopeptides, corresponding to peak II is also found in total cellular glycopeptides from transformed fibroblasts, associated with the concomitant decrease in low molecular weight glycopeptides (peak III) in control fibroblasts.

4 - Analysis of D-glucosamine and L-fucose labeled glycans released by hydrazinolysis/N-reacetylation.

In order to determine if the increase in molecular weight of some glycopeptides associated with malignant transformation is really reflecting an increase in the molecular weight of the glycan moiety and is not due to a significant heterogeneity of the peptidic backbone remaining after pronase digestion, glycopeptides from peaks II, III and IV were pooled, submitted to hydrazinolysis/N-reacetylation and re-analyzed by gel filtration on the same Ultrogel ACA 202 column. Fig. 3 and 4 present the results obtained with total cellular glycopeptides, after D-glucosamine or L-fucose labeling respectively.

It can be clearly seen, especially after L-fucose labeling (Fig 3), that the transformed fibroblasts are really enriched with higher molecular weight glycans, with a concomitant decrease of the lower molecular weight glycans.

The differences between the elution profiles of glycopeptides (Fig 3A) and of glycans released by hydrazinolysis/N-reacetylation (Fig 3B) are a slight shift toward lower molecular weight for the liberated glycans and a better resolution of different glycans inside each previous glycopeptide fractions.

Moreover, it is clear that the peptidic backbone heterogeneity, due to a different pronase susceptibility of glycoproteins from transformed cells is not responsible for the observed increase in molecular weight of some glycopeptides associated with malignant transformation.

Sequential affinity chromatography of glycopeptides on Con A and LCA-Sepharose.

1 - Affinity chromatography on Con A-Sepharose.

D-glucosamine labeled glycopeptides from cell surface, from the remaining cell pellets after trypsin treatment and from whole cells from ACA 202 fraction II, III, and IV were pooled and fractionated by affinity chromatography on immobilized Con A-Sepharose column.

The results of such a fractionation are presented in Table 2. From the known structural basis of the interactions between Con A and glycopeptides (9), it can be concluded that biantennary glycans with a bisecting GlcNAc residue, tri- or tetraantennary glycans from mixed fractions II, III and IV account for approximately 73 % of total glycopeptides from transformed fibroblasts as compared to 66 % in control cells (FNR-C).

In contrast, biantennary N-acetyllactosaminic type glycopeptides account for 23 % of total glycopeptides from control cells as compared to 13.5 % in transformed fibroblasts (FE-C 0.01 M)

No important difference in the amount of oligomannosidic type glycopeptides (FE-C 0.3 M) was found between control (10.5 %) and transformed fibroblasts (13 %). Analysis of the oligomannosidic type glycans released either by enzymatic cleavage with endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase or by hydrazinolysis, by partition HPLC is now in progress in order to determine if the observed misregulation of branching of the N-acetylglucosaminic type glycans is not a consequence of modifications in the processing of these oligomannosidic glycans.

The increase of tri- and tetraantennary glycans observed in transformed cells is even more significant, when cell surface glycopeptides from pooled fractions II, III and IV are analyzed on immobilized Con A : 80.3 % versus 53.7 % for control cells and on the contrary, biantennary glycopeptides account for 42 % of the cell surface glycopeptides from control cells as compared to 14 % in transformed cells.

Cell surface glycopeptides don't contain many oligomannosidic type glycans (5 %) as compared to the remaining cellular glycopeptides after the action of trypsin which contain up to 20 % of oligomannosidic glycans.

The remaining cellular glycopeptides contain also a higher percentage of highly branched glycans in transformed cells (64 % versus 54 % for control cells.)

D-glucosamine labeled total cellular glycopeptides from ACA 202 fraction II, III and IV were also fractionated separately on immobilized Con A. Results are presented in Table 3.

Glycopeptides from peak II possess no affinity for Con A and represent tri- or tetraantennary glycopeptides and the obtained results (Table 3.) clearly show that fraction II, from transformed fibroblasts, contains a larger amount of these more complex glycans than control cells (29.5 % versus 49 %). Fraction III is enriched with biantennary

glycopeptides eluted with 0.01M α MG and control cells contain more biantennary glycopeptides than transformed fibroblasts (13.4 % versus 9.3 %). Fraction IV is enriched with oligomannosidic type glycopeptides and no important difference was found between control (6.6 %) and transformed cells (9.7 %).

2 - Affinity chromatography on LCA-Sepharose.

Each glycopeptide fraction, obtained by affinity chromatography on Con A-Sepharose, of either glycopeptides from cell surface, from the remaining cell pellets after trypsin treatment or from whole cells, was fractionated on a LCA-Sepharose column.

Results are presented in Table 4.

From the known structural basis of the interaction between LCA and glycopeptides (9,24), a clear decrease of biantennary glycopeptides with an α -L-fucose residue in C-6 position on the N-acetylglucosamine residue involved in the glycosylamine linkage occurs in cell surface glycopeptides from transformed cells as compared to the glycopeptides prepared from control fibroblasts.

The ratio FE-C 0.01M FNR-L/FE-C 0.01M FE-L is equal to 0.13 for control cells and to 0.30 for transformed fibroblasts.

The same decrease is also found in total cellular glycopeptides eluted from Con A-Sepharose with 0.01M α MG (FE-C 0.01M), but no important variation was found in the similar glycopeptides obtained from the cell pellets after treatment with trypsin.

A similar decrease of α -1,6 fucosylation was found also on the glycopeptides, either from the cell surface, the remaining cell pellets or total cellular glycopeptides, non retained on Con A-Sepharose (FNR-C).

In each case, the fraction eluted from LCA-Sepharose (FNR-C FE-L) which represents either biantennary glycopeptides with a bisecting

β -GlcNAc residue and an α -L-fucose residue linked in C-6 position on the N-acetylglucosamine involved in the glycosylamine linkage (9) or triantennary glycopeptides with an α -linked mannose substituted at position C-2 and C-6 and the α -1,6 linked fucose (24) is smaller in transformed fibroblasts than in control cells.

Summarizing, the sequential lectin affinity chromatographies clearly show that the increase into tri- and tetraantennary N-acetyllactosaminic structures, mainly observed in cell surface glycopeptides from transformed fibroblasts, but also in total cellular glycopeptides, is really associated with malignant transformation. This increase is always associated with a concomitant decrease of the biantennary type glycans.

It is noteworthy that the increase into more branched glycans seems to be associated with a decrease of activity of an α -1,6 fucosyltransferase because control cells contain a relatively higher percentage of bi- and triantennary glycans with an L-fucose residue α -1,6 linked to the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine linkage.

Ion-exchange HPLC analysis of hydrazinolysis released glycans.

Glycopeptides from ACA202 fractions II and III were subjected to hydrazinolysis/N-reacetylation and the liberated glycans were fractionated according to their charges by ion-exchange HPLC. Five fractions were obtained : neutral (0), monosialylated (1), disialylated (2), trisialylated (3) and tetrasialylated (4). Fig.6 presents the results of such an analysis of D-glucosamine-labeled glycans from fractions II and III, and Table 5 gives the relative percentage of each type of glycan. The results (Fig. 6.A) show that glycans from fraction II of transformed fibroblasts are enriched

into more sialylated structures. In contrast, glycans from fraction III of normal cells are enriched into mono and disialylated structures (11.3 % and 10.9 % versus 7.1 % and 7.4 % for transformed fibroblasts) (Fig.6.B). The analysis reflects the fact that transformed cells contain more tri- and tetraantennary glycans which can possess one sialic acid residue on each antennae, resulting in the observed negative charge increase. The increase into heavier glycan structures is associated with a concomitant decrease of the biantennary type glycans, when compared to control fibroblasts.

By ion exchange HPLC analysis of hydrazinolysis released glycans, we were unable to characterize glycans with more than four sialic acid residues. This is in agreement with the work of YAMASHITA et al (25), who retracted previous finding of penta- and hexaantennary sugar chains in polyoma virus transformed BHK cells (8).

Discussion and conclusion

We have developed a fine fractionation procedure combining gel filtration analysis, sequential affinity chromatography on immobilized lectins and ion-exchange HPLC of glycopeptides from cell surface, from the remaining cell pellets and from total cellular glycoproteins from transformed and control fibroblasts. This procedure is of general application.

The results we obtained confirmed and extended previous data of BUCK et al. (2) and BLITHE et al. (26) according to whom cell surface glycopeptides, as well as glycopeptides obtained from the remaining cell pellets or total cellular glycoproteins exhibit a higher apparent molecular weight than those prepared from control non-transformed cells.

We clearly demonstrate that the increase in the molecular weight is not due to selective resistance of the peptidic backbone of glycoproteins from transformed cells to proteolysis. In fact, the increase in molecular weight of glycans released from these glycopeptides remains unchanged, when they are re-analysed by gel filtration on Ultrogel ACA 202.

Sequential affinity chromatography on immobilized Con A- and LCA-Sephadex allows us to precise that the main difference concerning the glycans of the N-acetylglucosaminic type is that transformed fibroblasts show a significant enrichment in tri- and tetraantennary glycans. The results are in good agreement with previous studies (7,8).

Moreover, the increase into more branched glycans seems also to be associated with a decrease of activity of a N-acetylglucosaminyl α -1,6 fucosyltransferase, because control cells contain a relatively higher percentage of bi- and triantennary glycans possessing an L-fucose residue α -1,6 linked to the N-acetylglucosamine residue involved in the N-glycosylamine linkage.

Ion-exchange HPLC analysis of the hydrazinolysis-released glycans from control and transformed fibroblasts shows a net increase of sialylated highly branched glycans associated with malignant transformation. On the other hand, glycans derived from control cells were enriched mainly with mono- and disialylated biantennary structures.

We were not able to characterize by ion exchange HPLC glycans bearing five or six sialic acid residues, corresponding to penta- and hexaantennary structures suggested by TAKASAKI et al. (8) in cellular glycopeptides from polyoma virus- transformed BHK fibroblasts. Our results clearly show that the difference between control and transformed cells are not qualitative, but rather quantitative : each glycan population exists in both cell types, but their expression in malignant transformation change. This arises the problem of the misregulation of some branching N-acetylglucosaminyltransferases associated with malignant transformation.

A study by YAMASHITA et al. of oligosaccharides released by hydrazinolysis from BHK cells and polyoma virus transformed BHK cells (PY-BHK) confirmed that transformation leads to an increase in highly branched sugar chains ; no penta- and hexaantennary glycans were found among the oligosaccharides (25) and our present result confirm this point.

Another important observation made by YAMASHITA et al. (25) is that an increase of the outer chains linked at C-6 position of the β -1,6 Man residue of the core is the cause of increase in the relative amount of highly branched oligosaccharides in the polyoma transformant. The same group found also that an increase in β -N-acetylglucosaminyl-transferase V activity may be the direct cause of the changes found in the sugar chains of surface glycoproteins of polyoma virus- transformed BHK cells. (27). However, a few discrepancies appear between some of their results and our own results. In our cell model, using "low passage" BHK cells and hamster sarcoma virus-transformed BHK cells, no significant variation was found in the

oligomannosidic type glycopeptides between control and transformed fibroblasts, in contrast with a marked reduction in this glycopeptide family associated with transformed cells found by Kobata's group.

We found also that the increase in tri- and tetraantennary glycans is clearly associated with a decrease in biantennary glycans in contrast with a very small variation in the BHK/Py-BHK model. The discrepancies can perhaps be explained by the fact that the studied BHK cells are different ("low passage" BHK cells versus pretumorigenic or even tumorigenic BHK cells and hamster sarcoma virus-transformed BHK cells versus polyoma virus-transformed BHK cells.)

Another important point is the different approaches used to compare glycan families from both cell lines. We choose to cofractionate metabolically labeled glycopeptides on well- calibrated immobilized lectins. In contrast, in their study, YAMASHITA et al. (25) used the methodology developed in KOBATA's laboratory, combining oligosaccharide releasing by hydrazinolysis, sequential exoglycosidase digestions and methylation analysis of the obtained oligosaccharide fractions.

But, our results as well as YAMASHITA et al. results (25) lead to the same conclusion that the occurrence of glycans of larger molecular weight is one of the most reproducible correlates with malignant transformation of cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. L. MONTAGNIER for his generous gift of the cells used in this study and to M. CONIEZ for culturing these cells.

This work was supported in part by grants from the CNRS, the DGRST (contrat n° 79-7-0669) and the MRI (contrat 82-L-1099).

REFERENCES

- 1 - MEEZAN, E., WU, H.C., BLACK, P.H. and ROBBINS, P.W. (1969)
Biochemistry, 8, 2518-2524.
- 2 - BUCK, C.A., GLICK, M.C. and WARREN, L. (1970) Biochemistry, 9,
4567-4576.
- 3 - WARREN, L., BUCK, C.A. and TUSZYNSKI, G.P. (1978) Biochim. Biophys.
Acta, 516, 97-127.
- 4 - VAN BEEK, W., SMETS, L. and EMMELOT, P. (1979) in Tumour markers :
impact and prospects (E. BOELSMA and Ph. RUMKE, eds) p. 61-78,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- 5 - SMETS, L.A. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 605, 93-111.
- 6 - BUCK, C.A., FUHRER, J.P., SOSLAU, G. and WARREN, L. (1974) J. Biol.
Chem., 249, 1541-1550.
- 7 - OGATA, S., MURAMATSU, T. and KOBATA, A. (1979) Nature, 259, 580-582.
- 8 - TAKASAKI, S., IKEHIRA, H. and KOBATA, A. (1980) Biochem. Biophys.
Res. Commun., 92, 735-742.
- 9 - DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G. and MONTREUIL, J. (1983)
Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (ed. T.C.
BØG-HANSEN and GA. SPENGLER), Walter de Gruyter, Berlin-New-York,
Vol. 3, pp 335-350.

- 10 - MAC PHERSON, I. and STOKER, M. (1962) *Virology*, 16, 147-151.
- 11 - MONTAGNIER, L. and LAGE-DAVILA, A. (1979) 2nd general meeting of ESACT, Paris. *Develop. Biol. Standard*, 42, p. 27-31, S. Karger, Basel.
- 12 - LAGE-DAVILA, A. and MONTAGNIER, L. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 577-584.
- 13 - OLIVER, G.J.A. and HEMMING, F.W. (1975) *Biochem. J.*, 152, 191-199.
- 14 - MURAMATSU, T., ATKINSON, P.M., NATHENSON, S.G. and CECCARINI, C. (1973) *J. Mol. Biol.*, 80, 781-799.
- 15 - GLICK, M.C. (1979) *Biochemistry.*, 18, 2525-2532.
- 16 - BAYART, B. and MONTREUIL, J. (1974) in J. MONTREUIL, *Actes du Colloque International n° 221 du CNRS sur les Glycoconjugués*, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin, p. 209-218, editions du CNRS, Paris.
- 17 - CARLSON, D.M. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 616-626.
- 18 - SCHAUER, R. (1978) in *Methods in Enzymology*, Vol 50, part c, 64-89.
- 19 - BAENZIGER, J.U. and NATOWICZ, M. (1981) *Anal. Biochem.*, 112, 357-361.
- 20 - DEBRAY, H. and MONTREUIL, J. (1978) *Biochimie*, 60, 697-704.

- 21 - BHAVANANDAN, V.P. and DAVIDSON, E.A. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 139-145.
- 22 - OHKUBO, Y., FUKUI, S., MUTOH, S. and YAMASHINA, I. (1983) *Cancer. Res.*, 43, 2712-2717.
- 23 - NILSSON, B., DE LUCA, S., LOHMANDER, S. and HASCALL, V.C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 10920-10927.
- 24 - KORNFELD, K., REITMAN, M.L. and KORNFELD, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6633-6640.
- 25 - YAMASHITA, K., OHKURA, T., TACHIBANA, S. and KOBATA, A. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 10834-10840.
- 26 - BLITHE, D.L. BUCK, C.A. and WARREN, L. (1980) *Biochemistry*, 19, 3386-3395.
- 27 - YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., OHKURA, T. and KOBATA, A. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 3963-3969.

Legends to Figures and Tables.

Figures

Fig. 1. General scheme of fractionation of glycopeptides and glycans from N-glycosylproteins.

Fig. 2. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 Column (100 cm x 1.6) equilibrated in Tris/Hcl 50mM, Nacl 0.17M buffer pH 7.4, of cellular glycopeptides labeled with radioactive D-glucosamine. Flow rate 9ml/h ; volume of fractions : 1.5 ml (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells. A : cell surface glycopeptides. B : glycopeptides from the cell pellets after trypsin treatment. C : total cellular glycopeptides.

Fig. 3. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of total cellular glycopeptides (A) and of hydrazinolysis-released glycans (B) labeled with radioactive L-fucose. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

Fig. 4. Fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of total cellular glycopeptides after D-[2-³H] mannose labeling.

(∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

Fig. 5. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel AcA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of hydrazinolysis-released glycans after D-glucosamine labeling. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

Fig . 6. HPLC analysis on Micropak AX.10 ion exchange column of ³H - and ¹⁴C - labeled glycans released by hydrazinolysis from fraction II (A) and from fraction III (B). Neutral glycans were eluted with water and sialylated glycans with a monopotassic phosphate pH 4.0 gradient. Flow rate : 1 ml/mn ; volume of fractions : 0.64 ml. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells. 0 : neutral glycans ; 1,2,3 and 4 : mono-, di-, tri- and

from fraction III (B). Neutral glycans were eluted with water and sialylated glycans with a monopotassic phosphate pH 4.0 gradient. Flow rate : 1 ml/mn ; volume of fractions : 0.64 ml. (∇) : normal cells ; (●) : transformed cells. 0 : neutral glycans ; 1,2,3 and 4 : mono-, di-, tri- and tetrasialylated glycans respectively.

Tables

Table 1. Relative proportions of the four glycopeptides fractions I to IV, obtained by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column of glycopeptides from cell surface, from the remaining cell pellets after trypsin treatment and from whole cells. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration. C: control cells ; T: transformed cells.

Table 2. Affinity chromatography of radioactive D-glucosamine labeled glycopeptides from mixed fraction II,III and IV (see Fig. 2) on immobilized con A-Sepharose. C : normal cells ; T : transformed cells.

Table 3. Affinity chromatography of radioactive D-glucosamine labeled total cellular glycopeptides from fractions II,III and IV (see Fig. 2) analyzed separately on immobilized Con A-Sepharose. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration in Fraction II,III and IV. C : normal cells ; T : transformed cells.

Table 4. Affinity chromatography on immobilized LCA-Sepharose of radioactive D-glucosamine labeled glycopeptides fractions obtained by ConA-Sepharose chromatography. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after ConA-Sepharose chromatography in each eluted fraction. C : normal cells ; T : transformed cells.

Table 5. Ion-exchange HPLC of glycans released by hydrazinolysis of glycopeptides from fractions II and III (see Fig. 2). Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration on ACA 202 column in fractions II and III.

C : normal cells ; T : transformed cells.

Table 1. Relative proportions of the four glycopeptides fractions I to IV, obtained by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column of glycopeptides from cell surface, from the remaining cell pellets after trypsin treatment and from whole cells. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration. C : control cells ; T : transformed cells.

Peak		I	II	II	IV
Cell surface glycopeptides	C%	2.20	19.20	57.20	21.40
	T%	2.30	48.20	31.50	18
remaining cellular glycopeptides after action of Trypsin	C%	17.5	33.1	32.60	16.80
	T%	14.7	42.80	21.90	20.60
Total cellular Glycopeptides	C%	24	29.5	29.5	17
	T%	14	49	20	17

Table 2. Affinity chromatography of radioactive D-glucosamine labeled glycopeptides from mixed fraction II,III and IV (see Fig. 2) on immobilized ConA- Sepharose. C : normal cells ; T : transformed cells.

	Cell surface glycopeptides		Remaining cellular glycopeptides after action of trypsin		Total cellular glycopeptides	
	C%	T%	C%	T%	C%	T%
FNR-C	53.7	80.3	54.1	64.2	66.7	73.1
FE-C 0.01M	41.9	14.2	26.6	15.1	22.8	13.6
FE-C 0.3 M	4.4	5.4	19	20.4	10.5	13.3

Table 3. Affinity chromatography of radioactive D-glucosamine labeled total cellular glycopeptides from fractions II,III and IV (see Fig. 2) analyzed separately on immobilized Con A-Sepharose. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration in Fraction II,III and IV. C : normal cells ; T : transformed cells.

	Fraction II		Fraction III		Fraction IV	
	C%	T%	C%	T%	C%	T%
FNR-C	29.5	49	14.7	8.9	6.5	4.9
FE-C 0.01M	0	0	13.4	9.3	3.9	2.4
FE-C 0.3M	0	0	1.4	1.80	6.6	9.7

Table 4. Affinity chromatography on immobilized LCA-Sepharose of radioactive D-glucosamine labeled glycopeptides fractions obtained by ConA-Sepharose chromatography. Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after ConA-Sepharose chromatography in each eluted fraction. C : normal cells ; T : transformed cells.

	Cell surface glycopeptides		Remaining cellular glycopeptides after action of trypsin		Total cellular glycopeptides	
	C%	T%	C%	T%	C%	T%
FNR-C FNR-L	42.0	13.7	41.6	56.6	57.9	65
FNR-C FE-L	11.6	6.5	13	7.6	7.9	7.3
FE-C 0.01M FNR-L	4.9	3.3	6.0	3.00	2.8	3.0
FE-C 0.01M FE-L	37	10.9	20.6	12.0	20.00	10.7
FE-C 0.3M FNR-L	N.D.	N.D.	19	20.4	10.5	13.0
FE-C 0.3M FE-L	N.D.	N.D.	0	0	0	0

Table 5. Ion-exchange HPLC of glycans released by hydrazinolysis of glycopeptides from fractions II and III (see Fig. 2). Percentages are given relatively to the total radioactivity recovered after gel filtration on ACA 202 column in fractions II and III. C : normal cells ; T : transformed cells.

Types of glycans	Fraction II		Fraction III	
	C %	T %	C %	T %
Neutral	0.5	1.3	4.1	3
Monosialylated	2	4.2	11.3	7.1
Disialylated	8	15.8	10.9	7.4
Trisialylated	10.7	17	2.7	1.7
Tetrasialylated	6.8	9	0.2	0.3

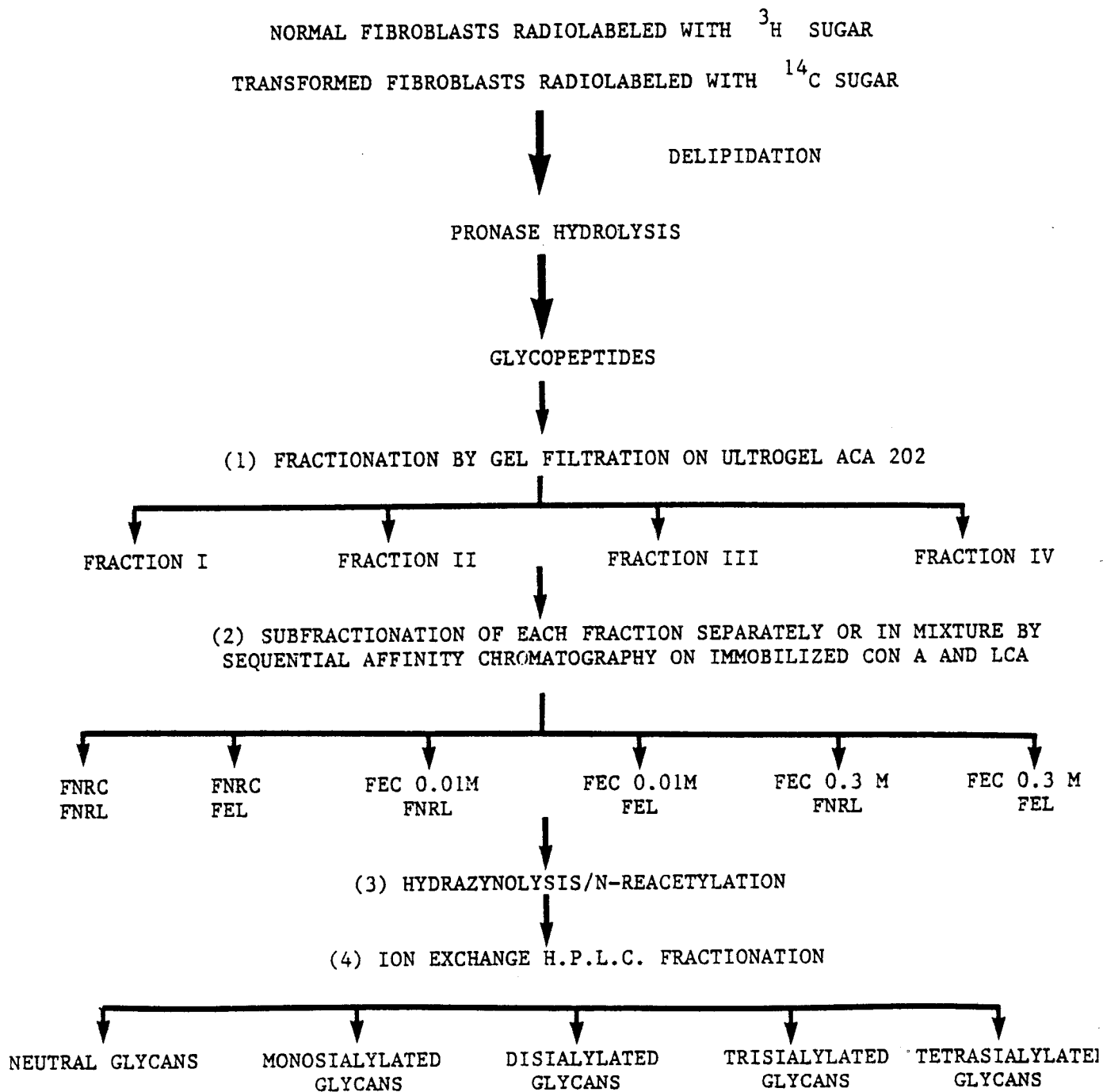


Fig. 1. General scheme of fractionation of glycopeptides and glycans from N-glycosylproteins.

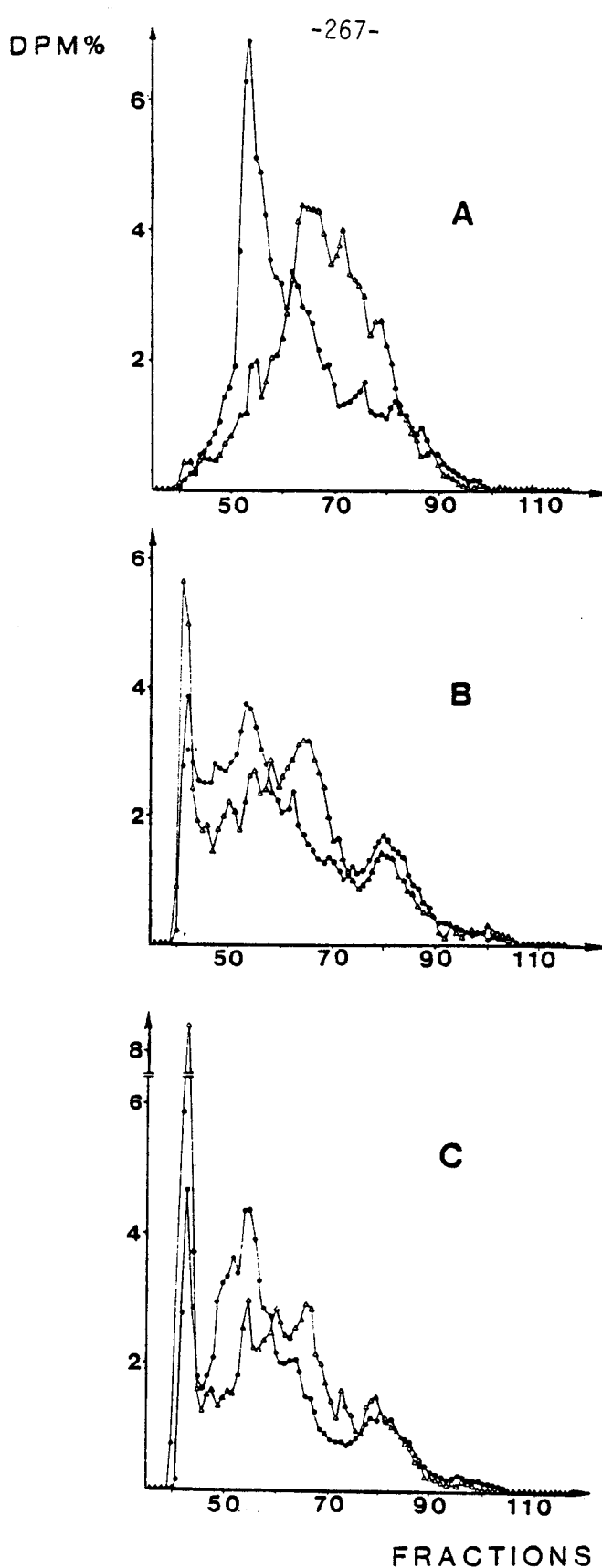


Fig. 2. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 Column (100 cm x 1.6) equilibrated in Tris/Hcl 50mM, Nacl 0.17M buffer pH 7.4, of cellular glycopeptides labeled with radioactive D-glucosamine. Flow rate 9ml/h ; volume of fractions : 1.5 ml (∇) : normal cells ; (●) : transformed cells. A : cell surface glycopeptides. B : glycopeptides from the cell pellets after trypsin treatment. C : total cellular glycopeptides.

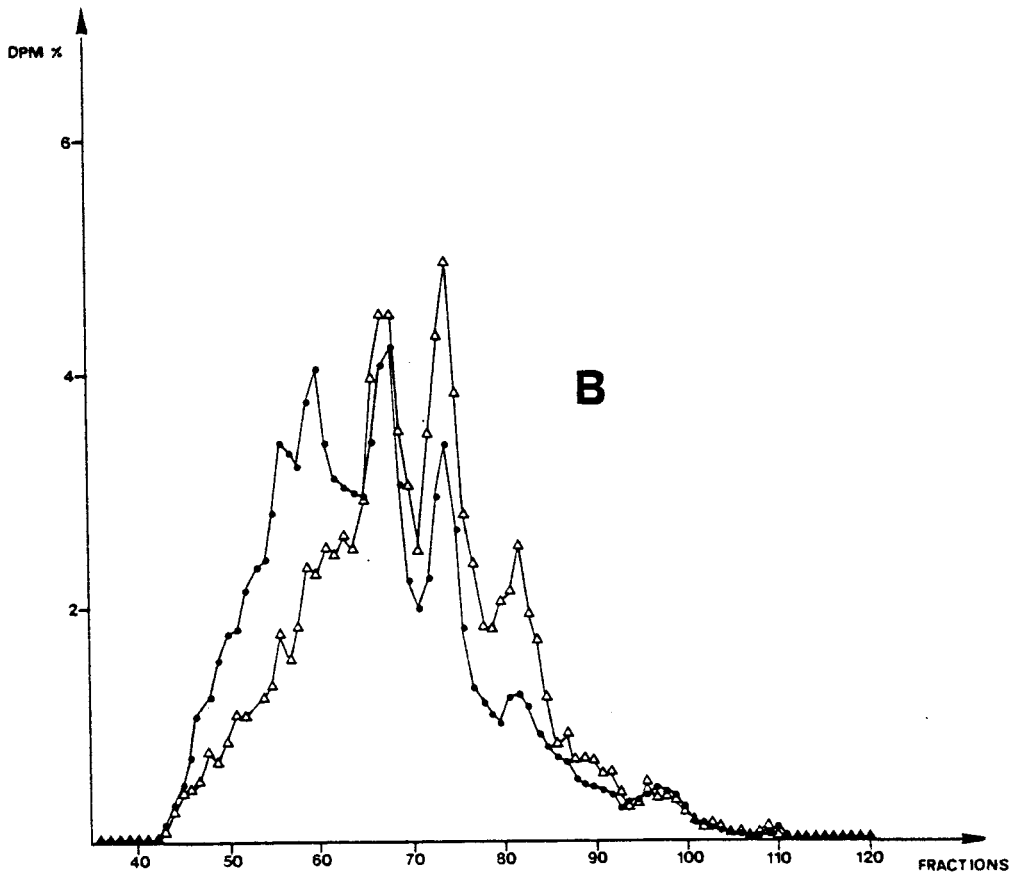
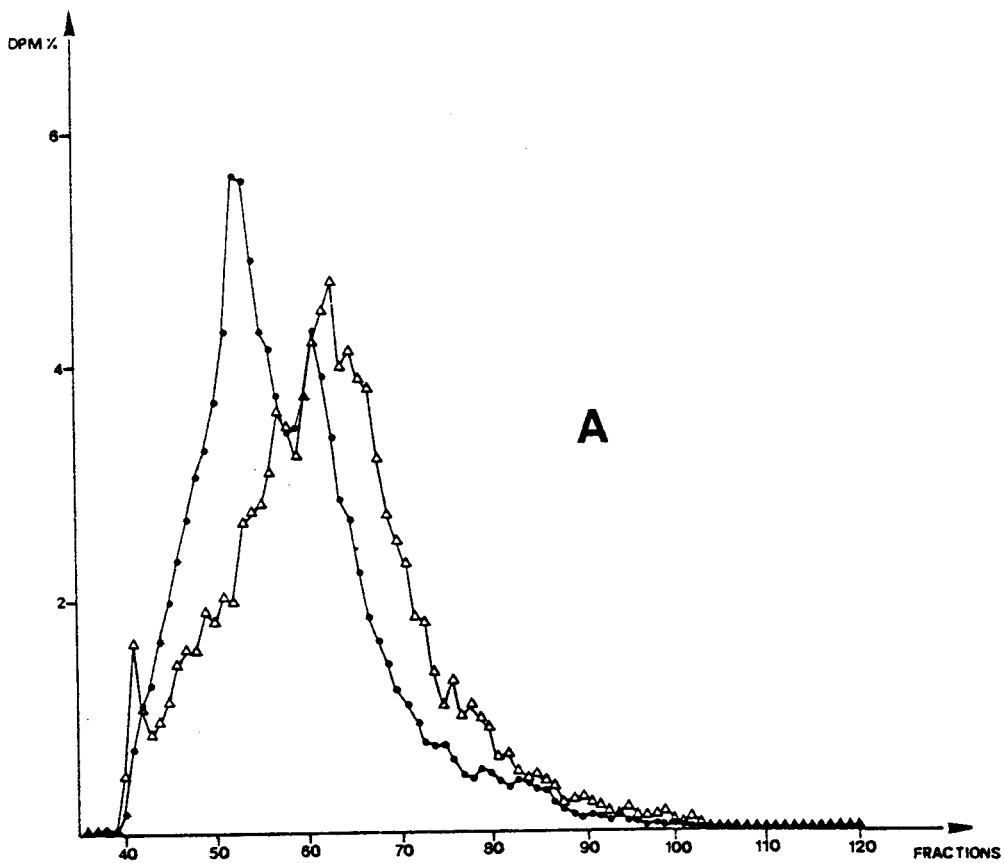


Fig. 3. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of total cellular glycopeptides (A) and of hydrazinolysis-released glycans (B) labeled with radioactive L-fucose. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

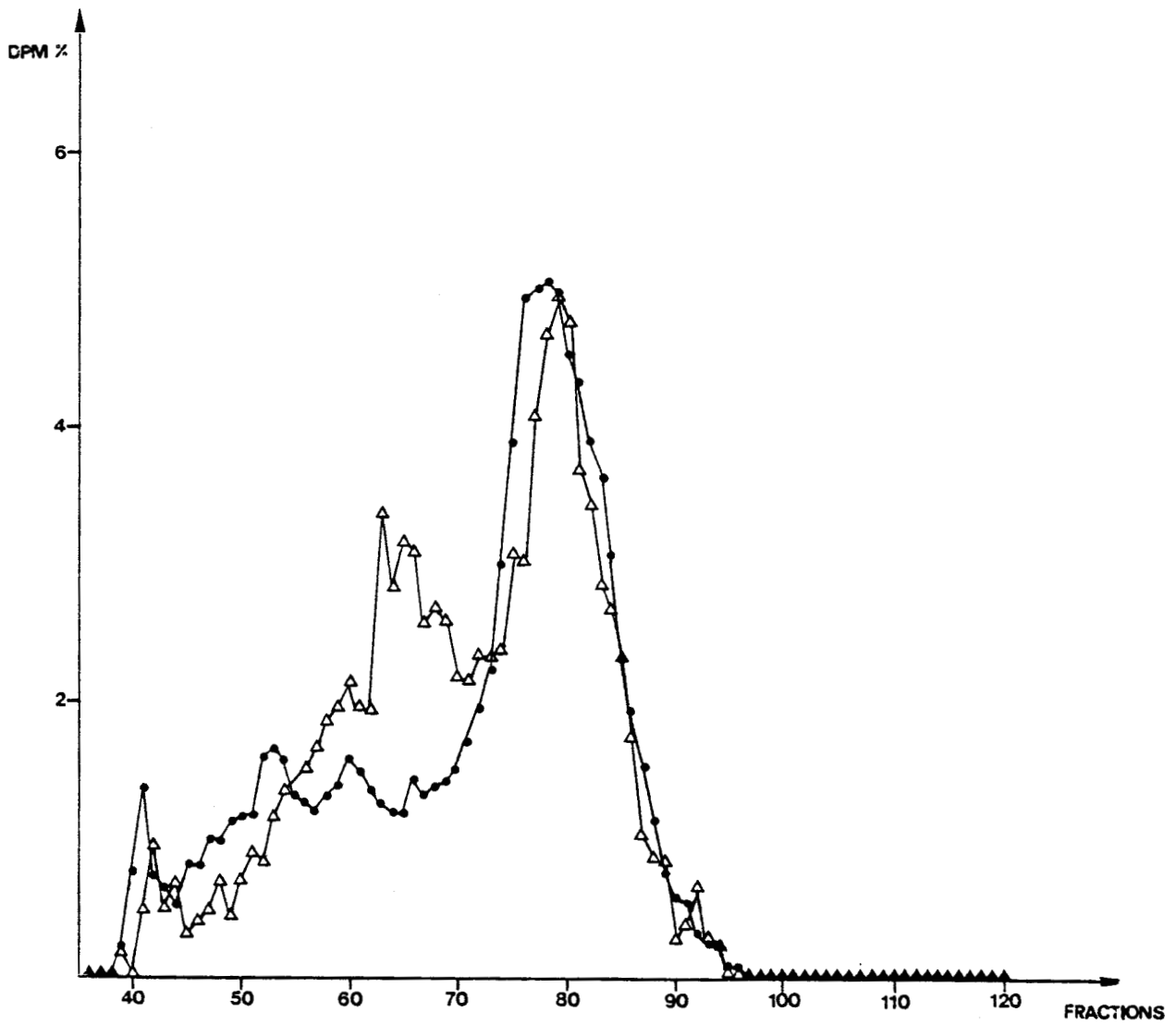


Fig. 4. Fractionation by gel filtration on Ultrogel ACA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of total cellular glycopeptides after \underline{D} -[2- 3 H] mannose labeling.

(∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

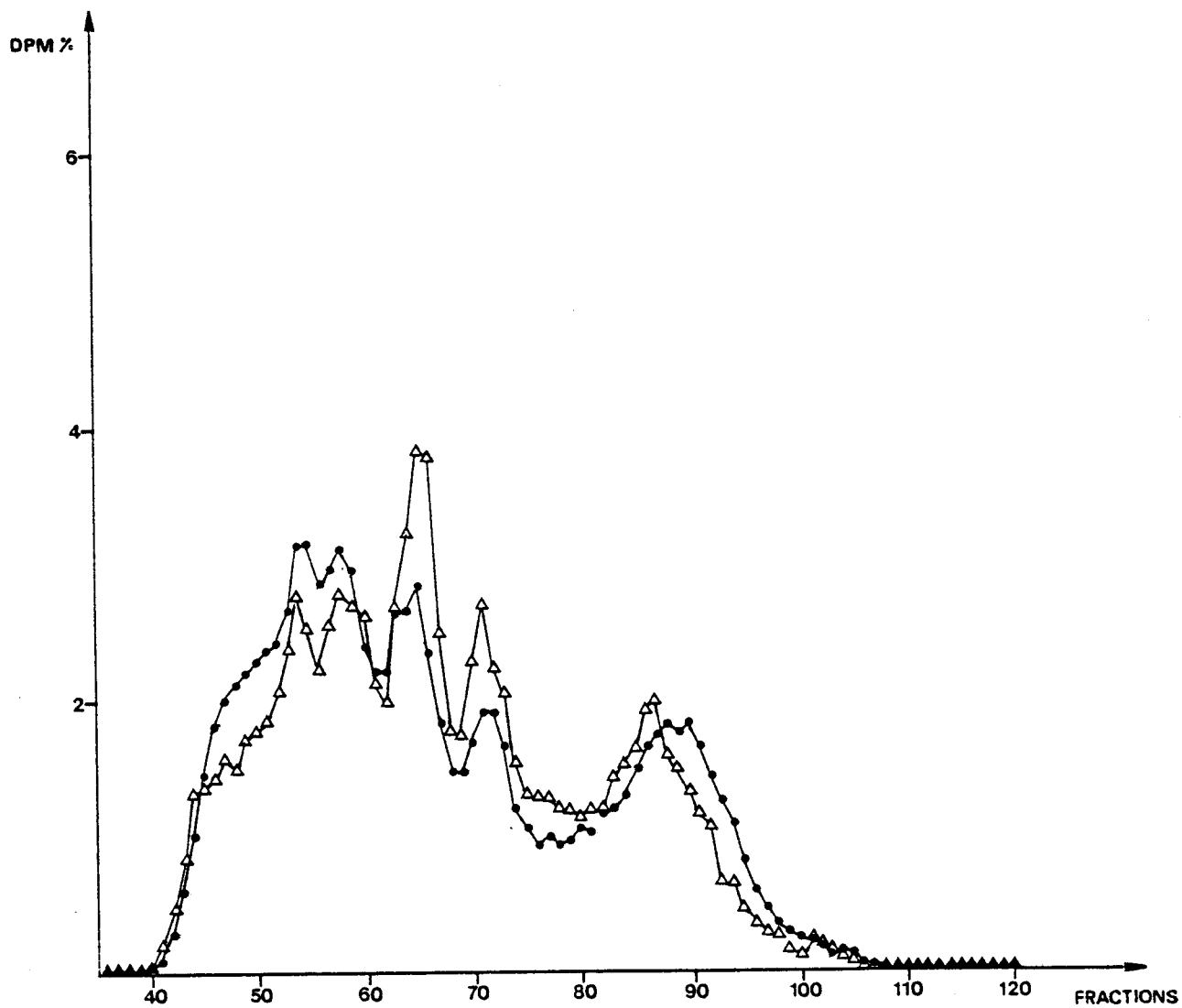


Fig. 5. Co-fractionation by gel filtration on Ultrogel AcA 202 column (same conditions as in Fig. 2) of hydrazinolysis-released glycans after D-glucosamine labeling. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells.

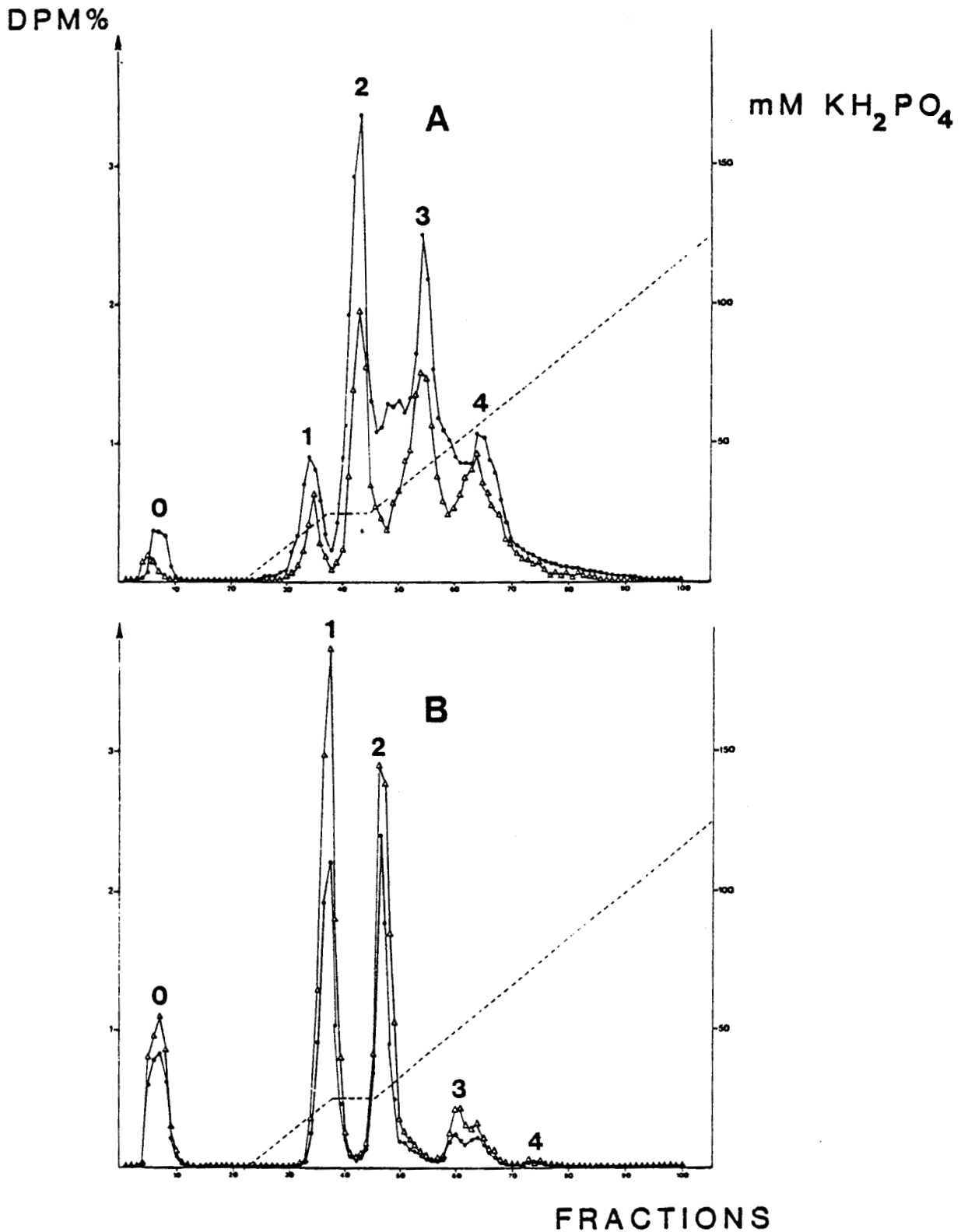


Fig . 6 . HPLC analysis on Micropak AX.10 ion exchange column of ^3H - and ^{14}C - labeled glycans released by hydrazinolysis from fraction II (A) and from fraction III (B). Neutral glycans were eluted with water and sialylated glycans with a monopotassic phosphate pH 4.0 gradient. Flow rate : 1 ml/mn ; volume of fractions : 0.64 ml. (∇) : normal cells ; (\bullet) : transformed cells. 0 : neutral glycans ; 1,2,3 and 4 : mono-, di-, tri- and tetrasialylated glycans respectively.

B) Etude comparée des glycanes des fibronectines secrétées par les deux types cellulaires

Cette étude avait pour buts :

1 - De démontrer que les glycopeptides libérés de la surface cellulaire par action ménagée de la trypsine provenaient essentiellement des fibronectines secrétées par les cellules et présentes dans les matrices extracellulaires.

2 - De vérifier si l'on retrouvait sur une glycoprotéine membranaire donnée, de préférence facilement purifiable, les modifications affectant les glycanes cellulaires totaux d'une cellule transformée. Nous avons alors envisagé de purifier les fibronectines dont on savait que leur taux diminuait à la surface des fibroblastes transformés et que cette disparition s'accompagnait d'une diminution de l'adhésivité cellulaire ainsi que d'une augmentation du pouvoir métastatique des cellules (PEARLSTEIN et al. [305]). Nous avons également envisagé de purifier les γ -glutamyltranspeptidases, glycoprotéines membranaires associées au transport transmembranaire des acides aminés et présentes dans les membranes plasmiques des cellules rénales et hépatiques. En effet, FIALA et al. [306] avaient démontré que l'activité enzymatique de cette glycoprotéine membranaire augmentait en cas d'hépatome.

La 5' nucléotidase, autre glycoprotéine membranaire bien caractérisée et relativement facile à purifier (WIDNELL et UNKELESS [307], pouvait constituer un autre modèle expérimental.

Notre choix s'est orienté vers l'isolement des fibronectines en raison de leur affinité pour les collagènes, permettant une purification très rapide par chromatographie d'affinité sur gélatine immobilisée sur Sépharose.

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication N°11.

Il faut signaler que depuis ce choix, YAMASHITA et al. [244] ont démontré dans un hépatome de rat, une augmentation du nombre de glycanes par molécule ainsi que la présence de glycanes de type N-acétyllactosaminique biantennés possédant une N-acétylglucosamine intercalaire (40 % des glycanes totaux) au niveau de la γ -glutamyltranspeptidase, ces glycanes à osamine intercalaire n'existant pas dans l'enzyme de foie sain.

* *
* *

PUBLICATION N°11

MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA FIBRONECTINE
PROVOQUEES PAR LA TRANSFORMATION DES CELLULES BHK21/C13 INDUITE PAR LE
VIRUS DU SARCOME DU HAMSTER. HYPOTHESE CONCERNANT L'ESSAIMAGE
METASTATIQUE PAR MASQUAGE DES SITES LECTINIQUES DE LA FIBRONECTINE.

C.R. ACAD. SCI. PARIS (1985), 301, SERIE III, 767-772.

* *
* *

BIOCHIMIE GÉNÉRALE. — *Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation de cellules BHK21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. Hypothèse concernant l'essaimage métastatique par masquage des sites lectiniques de la fibronectine.* Note de Philippe Delannoy, Henri Debray et Jean Montreuil⁽¹⁾, présentée par Paul Mandel.

La transformation de cellules BHK 21/C13 par le virus du sarcome du Hamster induit de profondes modifications de la structure des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique de la fibronectine sécrétée dans le milieu de culture. En effet, le rapport glycanes tri+tétraantennés/glycanes biantennés passe de 0,73 à 2,46. Tandis que le taux de sialylation s'accroît en raison de l'augmentation de la proportion de glycanes di-, tri- et tétrasialylés. Sachant que les glycanes tri- et tétraantennés adoptent une conformation étalée « en parapluie » qui est maintenue par des liaisons ioniques associant des résidus d'acide sialique et d'acides aminés basiques et qui couvre de larges superficies de la protéine, une hypothèse relative à la disparition de la fibronectine des tissus cancéreux et à l'essaimage métastatique est proposée sur la base d'un masquage, par les glycanes, des sites lectiniques des fibronectines issues des cellules néoplasiques.

GENERAL BIOCHEMISTRY. — Structural modifications of fibronectin glycans related to the transformation of BHK 21/C13 cells by the hamster sarcoma virus. Hypothesis concerning the metastatic diffusion based on the masking of lectin-sites of fibronectin.

Transformation of BHK21/C13 cells by the hamster sarcoma virus induces dramatic modifications of glycans of the N-acetyllactosaminic type from fibronectin secreted in the culture medium. In fact, the ratio tri + tetraantennary glycans/biantennary glycans increases from 0.73 to 2.46. Moreover, the fibronectin is enriched in sialic acid due to the increase of di-, tri- and tetrasialylated glycans.

An hypothesis is proposed concerning the mechanism of metastasis on the basis of the knowledge we have now of the spatial conformation of glycans. In fact, tri- and tetraantennary glycans, in adopting an extended conformation called "umbrella-conformation", firmly maintained by ionic bonds between sialic acid and basic amino acid residues, cover large area of the protein. The enrichment of fibronectin from cancerous cells in tri- and tetraantennary glycans and, in the same time, in sialic acid could be related: (i) to the decrease or loss of reactivity of the protein moiety of fibronectin by masking the lectin sites and (ii) to the disappearance of fibronectin from cancer tissues and, consequently, (iii) to the mechanism of the metastasis itself.

INTRODUCTION. — Les modifications profondes que connaissent les glycanes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses, ont été récemment définies. Elles concernent essentiellement les *N*-glycosylprotéines dont la proportion des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés augmente de façon très nette au détriment des structures biantennées ([1]-[6]). Ces transformations pourraient être en partie responsables des perturbations du « comportement social » que présente la cellule cancéreuse et, en particulier, de la diffusion métastatique ([7], [8]). A cet égard, le fait que la fibronectine, glycoprotéine extracellulaire qui joue un rôle fondamental dans l'association des cellules, diminue en quantité et disparaisse même de certains tissus cancéreux [9], nous a incités à entreprendre l'étude de la structure des glycanes de fibronectines sécrétées par des cellules en culture ayant subi une transformation maligne viro-induite.

Dans la présente Note, nous démontrons que, dans le cas de la fibronectine de cellules BHK 21/C13 transformées par le virus du sarcome du Hamster (cellules BHK 21/C13-HSV), le rapport glycanes tri+tétraantennés/glycanes biantennés est inversé et que, en outre, la sialylation est très fortement augmentée. Sur la base de ces observations, nous formulons l'hypothèse que ces modifications pourraient être impliquées dans la diffusion métastatique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — Les cellules ont été cultivées pendant 72 h en milieu de Eagle modifié [10] et additionné de [6-³H] glucosamine (4 μCi/ml) dans le cas des cellules BHK 21/C13 et de [1-¹⁴C] glucosamine (1 μCi/ml) dans le cas des cellules BHK 21/C13-HSV.

La fibronectine a été isolée des milieux de culture par chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Sepharose 4-B (Pharmacia, France) [11].

Les glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique ont été isolés en mélange par chromatographie sur Ultrogel AcA-202 (I.B.F., France), puis fractionnés [4] par chromatographie sur colonne (1 × 10 cm) de Con A

fixée sur Sepharose 4-B (Pharmacia). On obtient ainsi une « Fraction I » non retenue, une « Fraction II » éluée par une solution 0,01 M d' α -méthylglucoside et une « Fraction III », mineure et éluée par une solution 0,30 M d' α -méthylglucoside. Les fractions majeures I et II ont été soumises à une chromatographie sur colonne (1 x 10 cm) de LCA immobilisée sur Sepharose 4-B [4]. On obtient ainsi quatre sous-fractions selon que les glycopeptides n'ont aucune affinité pour la lectine (Fractions IV et VI) ou doivent, au contraire, être déplacés par une solution 0,15 M d' α -méthylglucoside (Fractions V et VII). Sur la base de l'affinité des deux lectines immobilisées, les structures des glycanes susceptibles d'être présents dans chacune des fractions sont données dans la figure 1.

Les glycanes obtenus par hydrazinolyse [12] ont été fractionnés, en fonction de leur teneur en résidus d'acide sialique, par chromatographie à haute performance (HPLC) sur une colonne d'échangeur d'anions Micropak AX-10 (Varian) [13] étalonnée à l'aide de glycanes neutres, mono-, di-, tri- et tétrasialylés isolés de l'orosomucoïde.

RÉSULTATS. — 1. Chromatographie de tamisage moléculaire des glycopeptides et des glycanes. — La chromatographie de tamisage moléculaire des glycopeptides pronasiques montre (fig. 2) une augmentation très nette de la masse moléculaire des glycanes de la fibronectine de BHK 21/C13-HSV. Une observation identique avait été rapportée [14] à propos de la fibronectine de cellules NIL 8. Cette augmentation concerne bien les glycanes eux-mêmes puisque nous avons obtenu le même résultat avec les glycanes libérés par hydrazinolyse (fig. 3).

Chromatographie d'affinité sur lectines des glycopeptides. — La chromatographie sur Con A révèle l'existence quasi exclusive, dans les deux fibronectines, de structures de type N-acétyllactosaminique (Fraction I + II). Elle confirme, en outre, les résultats apportés par la chromatographie de tamisage moléculaire. En effet, le rapport glycanes tri + tétra-antennés (Fraction I)/glycanes biantennés (Fraction II) passe de 0,73 à 2,46. Une observation identique a été récemment rapportée [15] à propos de la fibronectine de fibroblastes de poumon d'embryon humain transformés par le virus SV-40 où le même rapport passe de 1,74 à 5,07.

La chromatographie sur LCA confirme l'augmentation de la proportion des structures tri- et tétra-antennées et montre, en outre, que la fucosylation des glycopeptides biantennés de la Fraction II n'est pas affectée.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

Chromatographie d'échange d'ions des glycanes. — La HPLC sur échangeur d'anions des glycanes libérés par hydrazinolyse les fractionne en cinq familles allant des glycanes neutres aux glycanes tétrasialylés (tableau II). On observe que la transformation virale des cellules BHK 21/C13 entraîne une augmentation très nette à la fois de la proportion de glycanes sialylés et du taux de sialylation de la fibronectine. En effet, le pourcentage de glycanes neutres et monosialylés passe de 81 à 37% au profit de structures di-, tri- et tétrasialylées.

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1. — Schéma général de fractionnement des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de N-glycosylprotéines, associant la chromatographie d'affinité sur Con A et sur LCA. (●) GlcNAc; (○) Man; (□) Gal; (▲) NeuAc; (△) Fuc.

Fig. 1. — General scheme of fractionation of glycopeptides obtained by pronase digestion of N-glycosylproteins combining Con A and LCA-Sepharose columns. (●) GlcNAc; (○) Man; (□) Gal; (▲) NeuAc; (△) Fuc.

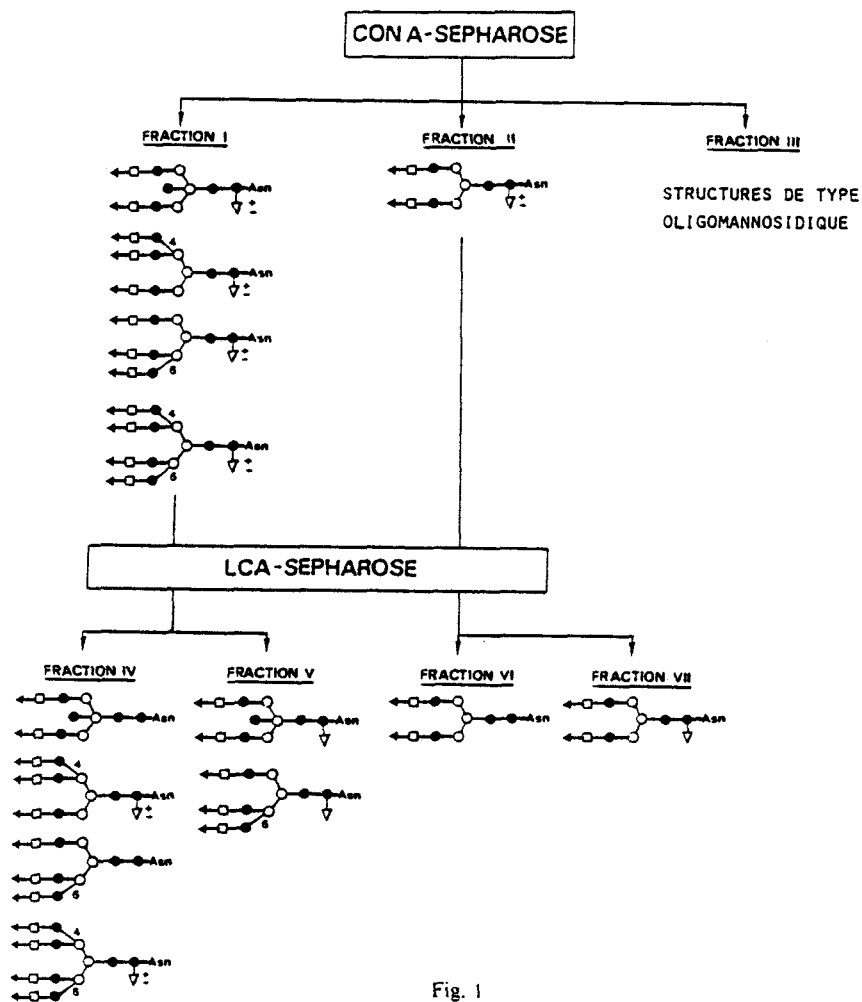


Fig. 1

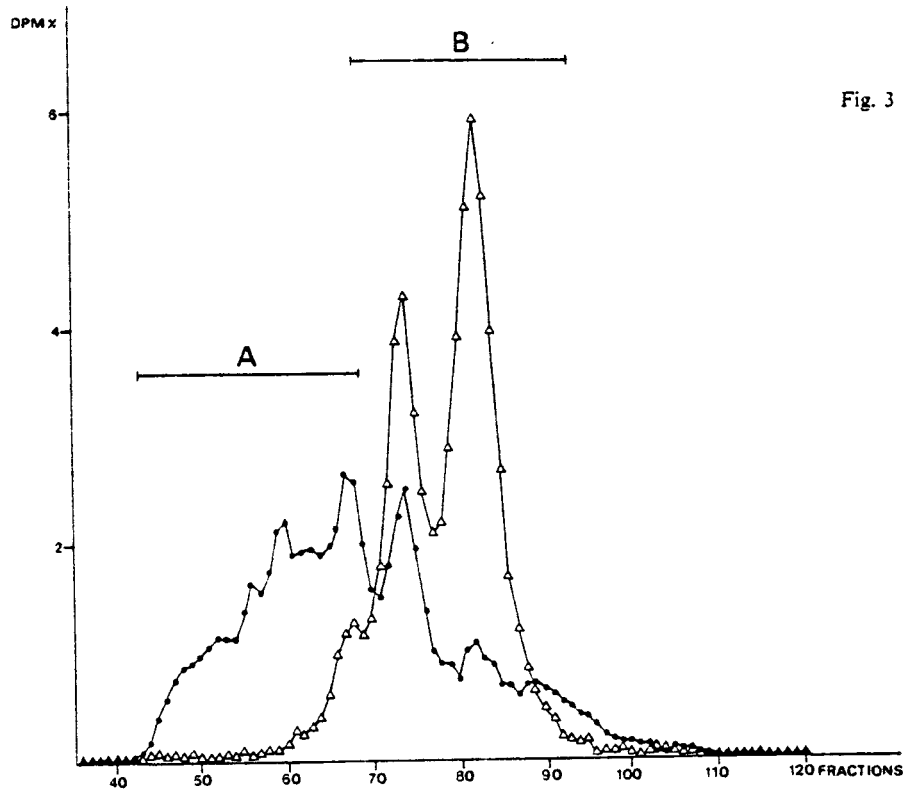
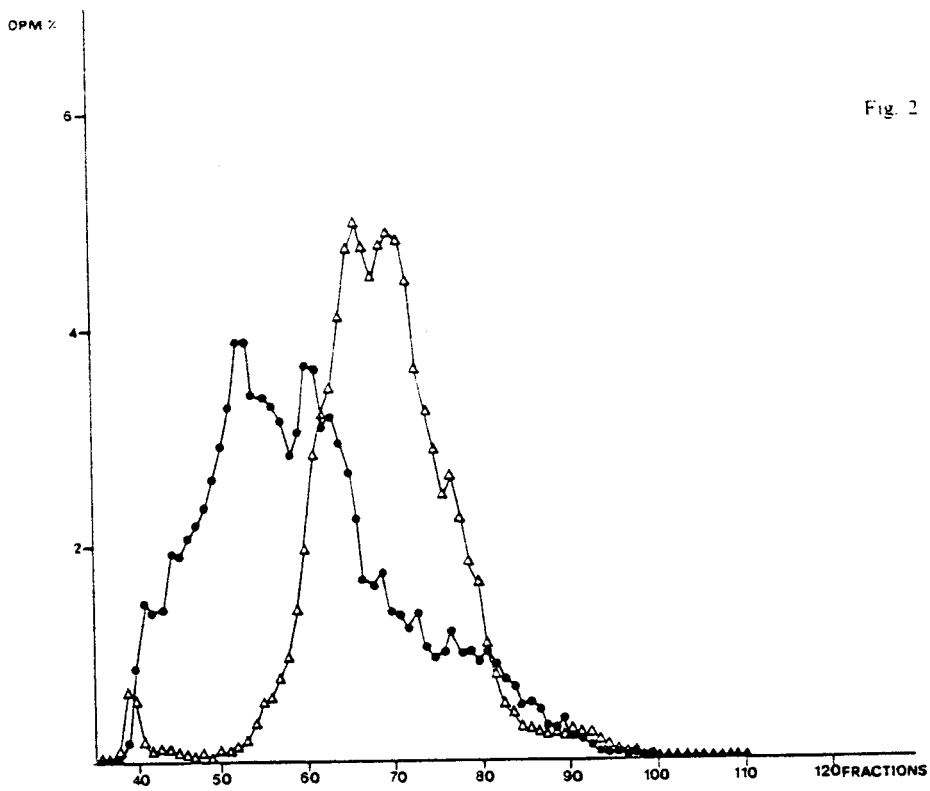
TABLEAU I

Répartition (en pour cent de la radioactivité totale des glycopeptides) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonnes de Con A et de LCA immobilisées des glycopeptides pronasiques des fibronectines de cellules BHK 21/C13 et BHK 21/C13-HSV.

Repartition (in percent of total glycopeptide radioactivity) of the fractions obtained by affinity chromatography on immobilized Con A and LCA columns of pronase glycopeptides from BHK21/C13 and BHK21/C13-HSV fibronectins.

	Fractionnement sur Con A			
	Fraction I	Fraction II	Fraction III	
BHK 21/C13	40	55	3	
BHK 21/C13-HSV	69	28	2	
	Sous-fractionnement sur LCA			
	de la Fraction I		de la Fraction II	
	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI	Fraction VII
BHK 21/C13	29	11	11	44
BHK 21/C13-HSV	63	6	6	22

PLANCHE II/PLATE II



C. R. Acad. Sc. Paris, t. 301, Série III, n° 17, 1985

Planche II

Fig. 2. — Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne d'Ultrogel AcA 202 (100 × 1,6 cm; tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4/NaCl 0,17 M; débit 9,0 ml/h; fractions de 1,5 ml) des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique des fibronectines marquées par la *N*-acétylglucosamine radioactive sécrétées par des cellules BHK 21/C13 (Δ-Δ-Δ) et BHK 21/C13-HSV (●-●-●). Les résultats sont exprimés en pour cent de la radioactivité totale.

Fig. 2. — Gel filtration on Ultrogel AcA 202 column (100 × 1.6 cm; Tris/HCl 50 mM, pH 7.4/NaCl 0.17 M buffer; flow rate 9.0 ml/h; volume of fractions: 1.5 ml) of glucosamine labelled glycopeptides obtained by pronase digestion of fibronectins from BHK 21/C13 (Δ-Δ-Δ) and BHK 21/C13-HSV (●-●-●) cells. Results are given in percent of total radioactivity.

Fig. 3. — Chromatographie de tamisage moléculaire (pour les conditions expérimentales, cf. fig. 2) des glycanes libérés par hydrazinolyse des glycopeptides totaux obtenus par hydrolyse pronasique des fibronectines sécrétées par des cellules BHK 21/C13 (Δ-Δ-Δ) et BHK 21/C13-HSV (●-●-●). Les résultats sont exprimés en pour cent de la radioactivité totale. A, fraction des glycanes dont le nombre des antennes est supérieur à 2; B, fraction des glycanes biantennés.

Fig. 3. — Gel filtration chromatography (for experimental conditions, see Fig. 2) of glycans liberated by hydrazinolysis of glycopeptides obtained by pronase digestion of fibronectins secreted by BHK 21/C13 (Δ-Δ-Δ) and BHK 21/C13-HSV (●-●-●) cells. Results are expressed in percent of total radioactivity.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — L'étude que nous avons réalisée sur la fibronectine de cellules BHK « normales » (BHK 21/C13) et transformées par le virus du sarcome du Hamster (BHK 21/C13-HSV) nous a permis d'étendre à une glycoprotéine extracellulaire les observations effectuées dans divers laboratoires ([1]-[6]) à propos des modifications que connaissent les glycanes des glycoprotéines des cellules transformées elles-mêmes.

Les glycanes majeurs de la fibronectine de fibroblastes de Hamsters normaux possèdent une structure de type *N*-acétyllactosaminique, biantennée, fucosylée, essentiellement neutre ou monosialylée, telle que l'ont décrite Fukuda et Hakomori [16]. La fibronectine des fibroblastes viro-transformés et oncogènes voit ses glycanes se modifier radicalement à deux niveaux : 1° la proportion de structures biantennées diminue fortement et passe de 62 à 28% après la transformation tandis que celle des structures tri- et tétraantennées croît de 30 à 69% dans la fibronectine transformée; 2° le taux de sialylation de ces structures est significativement augmenté puisque la transformation enrichit la fibronectine en glycanes di-, tri- et tétrasialylées qui n'existaient qu'en faible proportion dans la fibronectine normale. Cet enrichissement en acide sialique s'explique à la fois par une augmentation de la sialylation des glycanes et par l'apparition d'une proportion importante de structures tri- et tétraantennées.

Si ces observations pouvaient être étendues à d'autres lignées cellulaires cancéreuses, l'augmentation du nombre des antennes et du taux de sialylation des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique des fibronectines pourrait devenir un marqueur de la transformation maligne des cellules. En outre, la connaissance que nous possédons à présent de la conformation spatiale des glycanes nous permet de poser en hypothèse que l'antennarisation et la sialylation accrue des glycanes de la fibronectine de cellules cancéreuses

TABLEAU II

Répartition (en pour cent de la radioactivité totale des glycanes), en fonction du nombre de résidus d'acide sialique, des fractions glycaniques libérées par hydrazinolyse des glycopeptides pronasiques totaux et séparées par HPLC d'échange d'ions.

Repartition (in percent of total glycan radioactivity), in terms of the number of sialic acid residues, of glycans liberated by hydrazinolysis of the pronase glycopeptide bulk and fractionated by ion exchange HPLC.

	Nombre de résidus d'acide sialique				
	0	1	2	3	4
BHK 21/C13	36	45	14	4	1
BHK 21/C13-HSV	12	25	33	23	6

pourraient compter parmi les facteurs de dissociation spontanée du tissu cancéreux, prélude à la diffusion métastatique. En effet, la construction de modèles moléculaires [17], puis des résultats expérimentaux [18] ont montré que les glycannes tri- et tétraantennés adoptaient une conformation étalée dite « en parapluie » couvrant des superficies importantes de la protéine, variant de 2 000 à 3 000 Å². Cette conformation est maintenue par les liaisons ioniques que contractent les résidus d'acide sialique et d'acides aminés basiques. Elle pourrait être à l'origine d'un masquage des sites lectiniques de la fibronectine qui, en diminuant ou en abolissant l'affinité de ces derniers, pourrait être à l'origine de la disparition de la fibronectine du tissu cancéreux et expliquer en partie l'aptitude que présentent les cellules néoplasiques à se dissocier spontanément.

Abréviations. — Asn, L-asparagine; Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcNAc, N-acétyl-D-glucosamine; Man, D-mannose; NeuAc, acide N-acétylneuraminique; Con A, concanavaleine A; LCA, lectine de *Lens culinaris*.

(¹) Avec la collaboration technique de Myriam Coniez.

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (CRE n° 832.029), du M.I.R. (Contrat 82-L-1099), de la Fondation pour la Recherche médicale et du C.N.R.S.

Le docteur L. Montagnier nous a aimablement fourni les lignées cellulaires.

Reçue le 21 août 1985, acceptée le 16 septembre 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] U. V. SAUTER et M. C. GLICK, *Biochemistry*, 18, 1979, p. 2533-2540.
- [2] S. I. OGATA, T. MURAMATSU et A. KOBATA, *Nature*, 259, 1979, p. 580-582.
- [3] S. TAKASAKI, M. IKEHIRA et A. KOBATA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 1980, p. 735-742.
- [4] H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK et J. MONTREUIL, in *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, T. C. BØG-HANSEN et G. A. SPENGLER éd., De Gruyter, Berlin, 1983, p. 335-350.
- [5] J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE et P. DELANNOY, in *Structural carbohydrates in the liver*, M. POPPER, W. REUTTER, E. KÖTTGEN et F. GUDAT éd., M.T.P. Press, England, 1983, p. 239-258.
- [6] H. DEBRAY, P. DELANNOY, P. DEBEIRE et J. MONTREUIL, in *Proc. VIIth International Symposium on Glycoconjugates*, Lund, M. A. CHESTER, D. HEINEGARD, A. LUNDBLAD et S. SVENSSON éd., Rahms, Suède, 1983, p. 172.
- [7] H. DEBRAY, *Bull. Cancer*, 66, 1979, p. 353-372.
- [8] L. A. SMETS, *Biochim. Biophys. Acta*, 605, 1980, p. 93-111.
- [9] K. M. YAMADA, in *Glycoconjugates*, M. I. HOROWITZ éd., Acad. Press, New York, 3, 1982, p. 331-362.
- [10] I. MACPHERSON et M. STOKER, *Virology*, 16, 1962, p. 147-151.
- [11] E. ENGVALL et E. RUOSLAHTI, *Int. J. Cancer*, 20, 1977, p. 1-5.
- [12] B. BAYARD et J. MONTREUIL, in *Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve-d'Ascq, 20-27 juin 1973*, J. MONTREUIL éd., C.N.R.S., Paris, 1974, p. 209-218.
- [13] J. U. BAENZIGER et M. NATOWICZ, *Anal. Biochem.*, 112, 1981, p. 357-361.
- [14] D. D. WAGNER, R. IVATT, A. T. DESTREE et R. O. HYNES, *J. Biol. Chem.*, 256, 1981, p. 11708-11715.
- [15] K. MURAYAMA, E. J. NICHOLS, S. B. LEVERY, W. G. CARTER et S. I. HAKOMORI, *Glycoconjugate J.*, 1, 1984, p. 155-169.
- [16] M. FUKUDA et S. I. HAKOMORI, *J. Biol. Chem.*, 254, 1979, p. 5451-5457.
- [17] J. MONTREUIL, in *Comprehensive Biochemistry*, A. NEUBERGER et L. L. M. VAN DEENEN éd., Elsevier, Amsterdam, 19B, Part II, 1982, p. 1-188; *Pure and Appl. Chem.*, 56, 1984, p. 859-877.
- [18] Z. Q. LI, S. K. PERKINS et M. H. LOUCHEUX, *Eur. J. Biochem.*, 130, 1983, p. 275-279.

Université des Sciences et Techniques de Lille-I,
Laboratoire de Chimie biologique et Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217,
59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

CONCLUSIONS

1° - Etude comparée des glycanes membranaires totaux.

Le résultat capital que nous avons obtenu concerne l'inversion des proportions : structures biantennées/structures tri- et tétraantennées dans les fibroblastes transformés, au profit des structures "lourdes" et au détriment des structures biantennées.

Pour la première fois, nous apportons la démonstration que cette augmentation de poids moléculaire, observée par chromatographie de tamisage moléculaire, provient bien des glycanes et non de la partie peptidique des glycopeptides analysés, car les glycanes libérés par hydrazinolyse présentent encore cette augmentation de poids moléculaire.

L'analyse des glycanes par HPLC d'échange d'ions montre aussi que la transformation s'accompagne d'une augmentation du taux de sialylation.

Cette polyantennarisation semble s'accompagner également d'une diminution de l'activité α -1,6-fucosyltransférase car les glycanes de type N-acétyllactosaminique des fibroblastes transformés renferment moins de L-fucose lié en α 1-6 sur l'osamine du point d'attache que ceux provenant de fibroblastes normaux.

Nos résultats démontrent également que les différences qui existent entre glycanes membranaires de fibroblastes normaux et transformés ne sont pas qualitatives, mais essentiellement quantitatives et sont, sur ce point, en accord avec ceux de BLITHE et al. [239].

D'autre part, ces résultats sont confirmés et surtout amplifiés lorsque le fractionnement est appliqué à des glycopeptides obtenus par action contrôlée de la trypsine sur les cellules entières, normales ou transformées ; les glycopeptides de surface des cellules transformées sont en effet considérablement enrichis en glycanes de type N-acétyllactosaminique polyantennés alors que les glycopeptides de surface des cellules normales renferment essentiellement des glycanes biantennés.

2° - Etude comparée des glycanes des fibronectines sécrétées par les deux types cellulaires.

Polyantennarisation et hypersialylation sont encore plus significatives lorsque le procédé général de fractionnement est appliqué aux fibronectines isolées de fibroblastes normaux ou transformés.

Les glycanes majeurs isolés de fibronectine de fibroblastes de rein de Hamster "normaux" possèdent une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée, fucosylée sur l'osamine du point d'attache. Ces glycanes sont essentiellement neutres ou monosialylés.

Par contre, la fibronectine, sécrétée dans le milieu de culture des fibroblastes viro-transformés, possède des glycanes modifiés radicalement à deux niveaux :

- la proportion de glycanes biantennés diminue fortement et passe de 62 à 28 % après transformation. Inversement, la proportion des structures tri- et tétraantennées croît de 30 à 69 % dans les fibronectines de cellules transformées. La même observation a été faite simultanément par WAGNER et al., 1981 [308], puis par MURAYAMA et al., 1984 [309] ;
- le taux de sialylation des glycanes est augmenté de façon significative et la transformation enrichit la fibronectine en structures di-, tri- et tétrasialylées, structures qui n'existaient qu'en faible proportion dans la fibronectine de fibroblastes normaux.

Cet enrichissement en acide sialique s'explique à la fois par une augmentation de l'activité α -2,3-sialyltransférase chez les fibroblastes transformés (DELANNOY et al., [310]) et par l'apparition d'une proportion importante de structures tri- et tétraantennées, substrats potentiels de cette sialyltransférase.

Les modifications que connaissent les glycanes de type N-acétyllactosaminique des glycoprotéines membranaires, en général, et des fibronectines, en particulier, posent le problème de la nature et de l'origine de ces déviations métaboliques affectant les N-acétylglucosaminyltransférases de branchement : YAMASHITA et al. [241] ont,

à cet égard, démontré récemment que l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V, impliquée dans le branchement de résidus de N-acétylglucosamine en (β 1-6) sur le mannose (α 1-6) du noyau pentasaccharidique, était doublée chez des fibroblastes de rein de Hamster transformés par le virus du polyome par rapport à son activité mesurée chez des fibroblastes normaux.

A ce titre, les fibronectines, dont l'isolement est aisé, constituent un excellent modèle expérimental pour l'étude des régulations de la biosynthèse des N-glycosylprotéines dans les cellules normales ou transformées.

Enfin, bien qu'aucun glycanne spécifique de la transformation maligne n'ait été caractérisé, jusqu'à présent, chez ces fibroblastes transformés l'étude des fractions glycanniques obtenues en appliquant le même schéma de fractionnement à des quantités de l'ordre de 5×10^9 fibroblastes normaux ou transformés est actuellement en cours et nous ne désespérons pas de mettre en évidence un ou plusieurs glycannes qui soient des marqueurs de la transformation maligne.

* *
* *

III - ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES DES
N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES DE CELLULES
URO-EPITHELIALES HUMAINES NORMALES ET CANCEREUSES

* *
* *

INTRODUCTION

Nous avons appliqué notre procédé général de fractionnement des glycopeptides membranaires totaux à 7 lignées de cellules uro-épithéliales humaines possédant des degrés de transformation différents, établies à partir de tissus sains ou cancéreux par le Professeur J. KIELER de l'Institut Fibiger de Copenhague (Danemark) et dont les caractéristiques biologiques étaient parfaitement définies (voir p.284).

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication N°12.

* * *

PUBLICATION N°12

ALTERED GLYCOSYLATION OF MEMBRANE GLYCOPROTEINS IN HUMAN UROEPITHELIAL
CELL LINES.

INT. J. CANCER (1986), 37, 607-611.

* * *

Int. J. Cancer: 37, 607-611 (1986)
 © 1986 Alan R. Liss, Inc.

ALTERED GLYCOSYLATION OF MEMBRANE GLYCOPROTEINS IN HUMAN UROEPITHELIAL CELL LINES

Henri DEBRAY^{1,5}, Zhu QIN^{2,6}, Philippe DELANNOY¹, Jean MONTREUIL¹, Danuta DUŚ³, Czesław RADZIKOWSKI³, Britta CHRISTENSEN⁴ and Jørgen KIELER⁴

¹Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Associé au CNRS No. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; ²Laboratory of Biochemistry, Wuhan University, Wuhan, People's Republic of China; ³Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53114 Wrocław, Poland; and ⁴The Danish Cancer Society, The Fibiger Institute, DK-2100 Copenhagen, Denmark.

Total cellular glycopeptides of 7 human uroepithelial cell lines that differ in the grade of transformation (TGr) were analysed by gel filtration and affinity chromatography on immobilized lectins. The 4 cell lines that are tumorigenic in nude mice and invasive *in vitro* (TGr III) possess more highly branched, tri- and tetraantennary N-acetylglucosaminic glycans, with less biantennary glycans than the 2 non-tumorigenic, non-invasive (TGr II) cell lines examined. The only exception to this general pattern is the third cell line, which is classified as TGr II. The cellular glycopeptide distribution pattern in this cell line is similar to that of the TGr III cells. The possible relationship between altered glycosylation of membrane glycoproteins and the expression of a malignant phenotype is discussed.

Changes in the expression of cell-surface glycoconjugates are well-known phenomena that accompany malignant transformation (for review: see Smets and van Beek, 1984). However, these alterations seem to differ according to the cellular model investigated. No clear correlation between these changes and certain important characteristics of tumor cells has been established. Moreover, only a few studies have been carried out with human tumor cells (Glick *et al.*, 1983; Santer *et al.*, 1984; Steele *et al.*, 1983).

In the search for a human cell model we selected a panel of previously characterized uroepithelial cell lines derived either from transitional-cell carcinoma or from normal uroepithelium. These lines were established and characterized biologically at the Fibiger Institute.

On the basis of the ability of these cells to grow in the absence of fibroblasts for prolonged periods of time, transformed cell lines could be distinguished from normal cells. Three grades of transformation (TGr) have been defined. TGr I cell lines are fibroblast-free, non-tumorigenic, and non-invasive uroepithelial lines with a prolonged but finite life span (<40 passages). TGr II cell lines are non-tumorigenic and non-invasive, with an infinite life span (>75 passages). TGr III cell lines produce tumors in nude mice and invade fragments of embryonic chick hearts *in vitro*.

These and other characteristics that are described in detail by Christensen *et al.* (1984) and by Kieler (1984) have made these cell lines a valuable tool in studies of various aspects of the biology of human transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder (Bubeník *et al.*, 1985; Christensen *et al.*, 1984; Duś *et al.*, 1985; Kieler, 1984; Vilien *et al.*, 1983). The aim of the present study was to examine the expression of total cellular glycopeptides on these cells and to relate our findings to their growth properties *in vitro*, tumorigenic capacity *in vivo* and invasiveness *in vitro*.

Lectins have been used earlier for the histochemical characterization of human urinary bladder cell lines (Alroy *et al.*, 1982; Duś *et al.*, 1985). In our previous studies of these cell lines (Duś *et al.*, 1985), we found that the presence or absence of specific lectin receptors may serve as markers of a malignant phenotype.

In the present study we used different lectins as tools to separate and identify carbohydrates. Using a scheme of fractionation developed earlier (Montreuil *et al.*, 1983) we performed comparative analysis of the distribution of glycans from N-glycosylproteins in various cell lines. The results obtained indicate that there is generally a direct correlation between the degree of transformation and the quantitative expression of highly branched N-acetylglucosaminic type glycans.

MATERIAL AND METHODS

Materials

D-1-¹⁴C glucosamine hydrochloride (55 mCi/mM) and D-6-³H glucosamine hydrochloride (34 Ci/mM) were obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, UK). Pronase (grade B) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Ultrogel ACA 202 was supplied by I.B.F. (Villeneuve-la-Garenne, France). Aqualyte liquid scintillation cocktail was obtained from J.T. Baker (DeVeuter, The Netherlands). Con-A-Sepharose was purchased from Pharmacia (Bois d'Arcy, France) and Biogel P₂ (200-400 mesh) from Biorad (Vitry-sur-Seine, France). *Lens culinaris* agglutinin (LCA) has been purified by affinity chromatography and coupled to Sepharose 4B at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel as previously described (Debray *et al.*, 1983). Fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA mixture and non-essential amino acids (NEAA) mixture were purchased from Flow (Irvine, Scotland) and dimethylsulfoxide (DMSO) from Serva (Heidelberg, FRG).

Abbreviations: TGr II, transformation grade II; TGr III, transformation grade III; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; MG, α methyl-D-glycoside; Con A, Concanavalin A; LCA, *Lens culinaris* agglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; UDS, unscheduled DNA synthesis.

⁵To whom reprint requests should be sent.

⁶On leave of absence.

Cell lines and culture conditions

The cell lines were derived from a histologically normal human bladder biopsy (HCV-29), normal human ureter tissue (Hu 609), or biopsies of transitional-cell carcinoma (TCC) of the bladder (Hu 1734, Hu 456 and Hu 549). During the *in vitro* propagation of HCV-29 and Hu 609 cells, various spontaneously transformed TGr III sublines (HCV-29T and Hu 609T) were obtained (Vilien *et al.*, 1983).

According to the criteria described in the opening paragraphs, the HCV-29, Hu 609 and Hu 1734 cell lines were classified as being TGr II (see Table I) and the remaining cell lines, HCV-29T, Hu 609T, Hu 564 and Hu 549, were classified as being TGr III. All cell lines were propagated *in vitro* as described previously (Bubenik *et al.*, 1985). Cells were passaged using a mixture of trypsin-EDTA (Flow) and maintained in plastic culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C with 5% CO₂ in Fib 41B growth medium supplemented with NEAA (non-essential amino acids) and 10% fetal bovine serum, both from Flow. Penicillin and streptomycin were present at final concentrations of 100 IU and 100 µg/ml, respectively.

The cells were stored in 10% DMSO/90% complete medium in liquid nitrogen and replaced with a fresh sample from the frozen stock every 2 months.

Radioactive labelling of cells

Exponentially growing cells were labelled metabolically with D-6-³H or D-1-¹⁴C glucosamine hydrochloride (62.5 µCi and 12.5 µCi/75 cm² Falcon flask, respectively) in fresh complete medium. After 48 hr, monolayer cell cultures were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested into PBS by gentle scraping and centrifugation.

Preparation of cellular glycopeptides

Cell pellets were delipidated according to the procedure of Oliver and Hemming (1975). Delipidated material was exhaustively digested for 72 hr with pronase according to Muramatsu *et al.* (1973). Up to this point, cellular material from each cell line was treated separately. Then, for comparative analysis ³H-labelled glycopeptides from one of the cell lines were mixed with ¹⁴C-labelled glycopeptides from the other and co-fractionated.

Fractionation of cellular glycopeptides

Gel filtration of Ultrogel ACA 202. A mixture of glycopeptides from the 2 differentially labelled cell lines to be compared was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and diluted with 1 ml of elution buffer (0.01 M Tris/HCl, pH 7.4, 0.17 M NaCl, 0.02% NaN₃). The material was chromato-

graphed on a column (100 × 1.6 cm) of Ultrogel ACA 202. Fractions of 1.5 ml were collected and 50-µl aliquots in 4 ml of Aqualyte liquid scintillation cocktail were counted for radioactivity. The ³H and ¹⁴C radioactivity of each fraction were differentially counted in a Beckman LS-9000 scintillation counter and the elution profiles were drawn by plotting ³H and ¹⁴C radioactivity eluted from the column.

Affinity chromatography of glycopeptides on Con A-Sepharose and LCA-Sepharose. Glycopeptides were applied to a column of Con A-Sepharose (10 × 1 cm) equilibrated with 0.005 M sodium acetate buffer, pH 5.2, containing 0.1 M NaCl and 1 mM MgCl₂, MnCl₂ and CaCl₂. Elution was carried out first with the above buffer, second with the buffer containing 0.01 methyl-D-glucoside and finally with the same buffer containing 0.3 M MG. After counting the radioactivity, selected fractions were pooled and desalted on a Biogel P₂ column (60 × 2.5 cm) equilibrated with water. Desalted fractions were concentrated and applied to a column of LCA-Sepharose (10 × 1 cm) equilibrated with NaCl/PBS buffer, pH 7.2. Elution was carried out first with the above buffer and then with the same buffer plus 0.15 M MG. Both affinity chromatographies were carried out at room temperature at a flow rate of 10 ml/hr. Fractions (1.5 ml) were collected and aliquots counted by liquid scintillation as described above.

RESULTS

Differentially (³H or ¹⁴C) labelled total cellular glycopeptides from the following pairs of uroepithelial cell lines were co-chromatographed on Ultrogel ACA 202: HCV-29 + HCV-29T, Hu 609 + Hu 609T, Hu 1734 + Hu 549, HCV-29 + Hu 456 and Hu 1734 + Hu 456.

Four major fractions (F1-F4) were collected. The most typical elution profile is shown in Figure 1 using co-fractionation of Hu 1734-Hu 549 cell glycopeptides. The material eluted in the void volume (F1) contained proteoglycans and large glycopeptides with O-glycosidically linked glycans and was not subjected to further analysis. However, from the comparison of the percentage of total radioactivity associated with this fraction, the cell lines studied could be classified into 2 groups (Table II). HCV-29 and Hu 1734 cells contained less material eluted at this fraction (F1) than the remaining cell lines (HCV-29T, Hu 609, Hu 609T, Hu 456 and Hu 549). These last 5 also contained more glycopeptides of high molecular weight (F2), approximately 4.5 KDa, than the remaining 2 cell lines. The mean value of F2 fraction was estimated to be 26.7% of the total glycopeptide radioactivity, while it was

TABLE I - MATERIAL SELECTED FOR GLYCAN STUDIES

Origin	Transitional epithelium	Cell line
Non-malignant	Non-tumorigenic ¹ , non-invasive ² , TGr II	HCV-29 (bladder) Hu 609 (ureter)
	Tumorigenic—invasive, TGr III	HCV-29T ³ Hu 609T ³
Tumor	Non-tumorigenic, non-invasive, TGr II	Hu 1734
	Tumorigenic—invasive, TGr III	Hu 456 Hu 549

¹Tumorigenicity in nude mice. ²Invasiveness *in vitro* in co-cultures with embryonic chick fragments. ³Transformed "spontaneously" *in vitro*.

MEMBRANE GLYCOPROTEINS IN UROEPITHELIAL CELLS

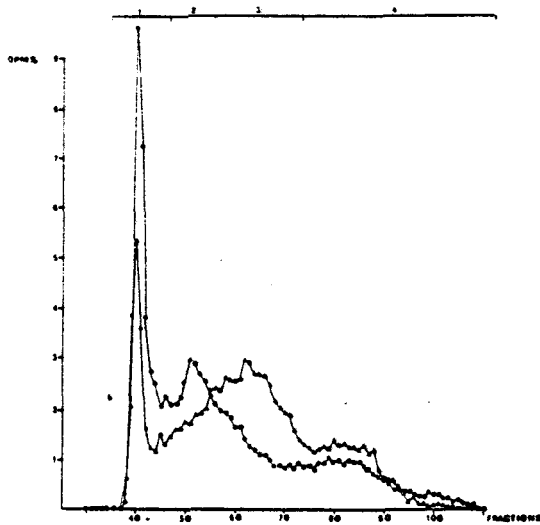


FIGURE 1 - Elution profiles of total cellular glycopeptides fractionated on Ultrogel ACA 202 from: Δ , ^3H GlcNH $_2$ -labelled Hu 1734 cells and \bullet , ^{14}C GlcNH $_2$ -labelled Hu 549 cells.

only 20.5% for the HCV-29 and Hu 1734 lines (Table II). The F2 fraction contains tri- and tetraantennary, or even more complex N-glycopeptides. Concomitantly, HCV-29T, Hu 609, Hu 609T, Hu 456 and Hu 549 contained relatively fewer glycopeptides in the F3 eluate: the mean value for these cells was 23% vs 42.6% for the HCV-29 and Hu 1734 lines.

The F3 contained glycopeptides that are considered to be biantennary glycopeptides of N-acetylglucosaminic type. In the F4 eluate, which contains mainly glycopeptides of the oligomannosidic type, the amount of radioactive labelled glycopeptides varied from 14.4% to 23.0% (Table II). In this case, no correlation was observed among the cell lines studied, while correlations have been found for the F1 and F3 fractions.

Radioactive glucosamine-labelled glycopeptides from F2, F3 and F4 fractions were pooled and co-fractionated by affinity chromatography on Con A and, subsequently, on LCA-Sepharose. The results expressed as percentage of total radioactivity are summarized in Table III.

Knowing the basis for interactions between Con A and glycopeptides (Debray *et al.*, 1983; Kornfeld *et al.*, 1981), it was possible to divide the analysed cell lines into 2 groups. The first group was represented by the HCV-29 and Hu 1734 lines. Both of these lines contained more biantennary glycans of the N-acetylglucosaminic type (FE-C 0.01 M) than the remaining cell lines (mean values: 25.35% vs 15%).

The second group, consisting of lines Hu 609, Hu 609T, HCV-29T, Hu 456 and Hu 459, contained more tri-, tetraantennary and even more complex glycans or biantennary glycans with a bisecting GlcNAc residue (FNR-C mean 71.8%) than the other 2 lines HCV-29 and Hu 1734 (FNR-C mean 59.1%). The percentage of oligomannosidic glycopeptides (FE-C 0.3 M) varied from 8.3 to 19.6%, and no correlations were observed among any of the cell lines examined.

Refractionation of the FNR-C fraction on LCA-Sepharose revealed that comparable amounts of glycopeptides from all cell lines were bound (FNR-C, FE-L from 5.9% to 2.5%). These were either biantennary glycans with a bisecting β -GlcNAc residue that possessed an α -L fucose residue linked in C-6 position to the N-acetylglucosamine in the GlcNAc-Asn linkage (Debray *et al.*, 1983; Kornfeld *et al.*, 1981), or triantennary glycopeptides with one of the α -linked mannose residues substituted at positions C-2 and C-6, which also possess an α -1, 6-linked fucose residue (Kornfeld *et al.*, 1981). In contrast, HCV-29 and Hu 1734 cell lines contained more biantennary glycopeptides possessing α -L-fucose residue in the C-6 position of N-acetylglucosamine residue involved in the GlcNAc-Asn linkage (FE-C 0.01 M FE-L). The mean value for these two lines was 18.8%, and only 10.4% for the remaining cell lines.

DISCUSSION

Comparative studies of 7 human uroepithelial cell lines, classified as belonging to either TGr II or TGr III, revealed only quantitative differences in their total cellular glycopeptides. As shown by combined gel filtration analysis and sequential affinity chromatography on immobilized Con A and LCA, 5 of the lines analysed, HCV-29T, Hu 609, Hu 609T, Hu 456 and Hu 549 contained significantly more of the large-sized glycopeptides. These lines showed a relative, but marked, increase in tri- and tetraantennary glycans, with a parallel decrease in the amount of biantennary glycans.

TABLE II - RELATIVE PROPORTIONS OF THE 4 GLYCOPEPTIDE FRACTIONS OBTAINED BY GEL FILTRATION OF RADIOLABELLED TOTAL CELLULAR GLYCOPEPTIDES ON ULTROGEL ACA 202 COLUMN. VALUES OF EACH FRACTION ARE GIVEN AS A PERCENTAGE OF TOTAL RADIOACTIVITY RECOVERED

Cell line	Fraction ¹					
	1	2	Mean	3	Mean	4
HCV-29	23.7	21.7	20.5	37.8	42.6	16.6
Hu 1734	15.5	19.4		47.4		17.7
Hu 609	30.7	25.75		21.0		22.5
HCV-29T	33.0	29.1	26.7	23.3	23.0	14.5
Hu 609T	31.9	25.9		19.0		23.0
Hu 456	27.45	26.2		24.85		21.5
Hu 549	30.8	26.35		26.6		16.25

¹Fraction 1, proteoglycans and large glycopeptides with O-glycosidically linked glycans; Fraction 2, glycopeptides of high molecular weight (tri- and tetraantennary, or more complex N-glycosylpeptides); Fraction 3, biantennary glycopeptides of the oligomannosidic type; Fraction 4, glycopeptides of the oligomannosidic type.

DEBRAY ET AL.

TABLE III - AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF D-GLUCOSAMINE RADIOLABELLED GLYCOPEPTIDES FROM POOLED F2, 3 AND 4 FRACTIONS ON CON-A-SEPHAROSE (S-CON A) AND LCA-SEPHAROSE (S-LCA). VALUES FOR EACH FRACTION ARE GIVEN AS A PERCENTAGE OF TOTAL RADIOACTIVITY RECOVERED AFTER ULTROGEL ACA 202 GEL FILTRATION IN FRACTIONS 2, 3 AND 4¹

Cell line	% of total radioactivity (mean)				Mean	FE-C 0.3 M
	S-Con A	FNR-C	Mean	FE-C 0.01 M		
HCV-29		63.9		25.0		11.1
Hu 1734		54.3	(59.1)	26.1	(23.4)	19.6
Hu 609		70.5		15.2		14.3
HCV-29T		77.7		13.9		8.3
Hu 609T		68.5	(71.8)	16.8	(15.0)	14.6
Hu 456		69.0		15.0		16.0
Hu 549		73.5		14.0		12.5

S-LCA	FNR-C		FE-C 0.01 M		(Mean)	FE-C 0.3 M	
	FNR-L	FNR-L	FNR-L	FEL-L		FNR-L	FE-L
HCV-29	58.1	5.7	7.1	17.9		10.5	0.6
Hu 1734	50.7	3.5	6.5	19.7	(18.8)	17.4	2.2
Hu 609	64.75	5.9	3.75	11.3		12.6	1.7
HCV-29T	74.1	3.5	3.7	10.3		8.2	0.1
Hu 609T	66.0	2.5	5.9	10.9	(10.4)	12.3	2.3
Hu 456	64.0	4.8	4.7	10.1		14.6	1.0
Hu 549	69.6	3.9	4.5	9.5		10.5	2.0

¹FNR, fraction not retained; FNR-C, fraction not retained on a Con-A-Sepharose column; FE-C 0.01 M, fraction eluted from a Con-A-Sepharose column with 0.01 MαMG; FE-C 0.3 M, fraction eluted from a Con-A-Sepharose column with 0.3 MαMG; FNR-C FNR-L, fraction not retained on Con-A and LCA-Sepharose columns; FNR-C FE-L, fraction not retained on Con-A-Sepharose and eluted from LCA-Sepharose; FE-C 0.01 M FNR-L, fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.01 MαMG and not retained on LCA-Sepharose; FE-C 0.01 M FE-L, fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.01 MαMG and eluted from LCA-Sepharose; FE-C 0.3 M FNR-L, fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.3 MαMG and not retained on LCA-Sepharose; FE-C 0.3 M FE-L, fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.3 MαMG and eluted from LCA-Sepharose.

The carbohydrate changes accompanying the process of malignancy of human cells described so far indicate an alteration in the molecular weight of the glycopeptides containing fucose (Santer *et al.*, 1984) and also a shift in the elution profile of glycopeptides from tumor cells compared to corresponding control cells (Smets and Van Beek, 1984).

In our studies, we have examined glycan structure from N-glycosylproteins by their affinity to the immobilized lectins Con A and LCA. Thus, consistent differences in the higher molecular weight region were detected between TGr II and TGr III cell lines. The only exception was the Hu 609 cell line that was classified as TGr II. Its glycopeptide size distribution was similar to that of TGr III cell lines. Furthermore, the Hu 609 line exhibited an increased branching of carbohydrates, while no such changes were observed in the two other TGr II cell lines (HCV-29 and Hu 1734).

In our previous studies with these cell lines using FITC-labelled lectin (Duš *et al.*, 1985) the Hu 609 cell line also demonstrated different properties. These cells exhibited the multiple microvilli that were once postulated to be a marker of transformed or malignant cells (Kolata, 1975). This may suggest that Hu 609 cells adapted to grow in tissue culture have some phenotypic instability, and the possibility that the carbohydrate changes may precede the manifestation of transformed phenotype cannot be excluded.

Hu 609 cells resemble the 2 other TGr II cell lines by their lack of tumorigenic and invasive properties and their near-diploid chromosomal mode (Christensen *et al.*, 1984); moreover, in contrast to TGr III cells, they have retained their HLA expression (Vilien *et al.*, 1983). However, unlike the two other TGr II cell lines, they resemble the TGr III cells by their high saturation density, their ability to form colonies in semisoft agar (Christensen *et al.*, data not shown) and

their reduced UDS response to ultimate carcinogens, (data not shown). Thus, they may represent an intermediate stage of transformation between TGr II and TGr III.

The differences in highly branched oligosaccharides were quantitative. Each of the glycan populations was represented in malignant as well as in non-malignant cells. Similar observations were made on cells with different metastatic potentials where quantitative changes of cell-surface glycoconjugates have occurred (Nicolson, 1982; Yogeewaran, 1983). It is possible that similar phenomena apply to invasiveness as expressed in *in vitro* experiments.

In summary, the results obtained are in agreement both with our previous observations made on hamster HSV/BHK/t cells (Montreuil *et al.*, 1983) and with the data of other authors (Glick *et al.*, 1983; Nicolson, 1982; Ogata *et al.*, 1976; Smets and Van Beek, 1984; Warren *et al.*, 1978), which indicate an increase in highly branched oligosaccharides in transformed, tumorigenic cells. The differences observed in the size and branching pattern of N-glycosylproteins indicate a modified type and/or rate of glycosylation of membrane proteins (Yamashita *et al.*, 1985) rather than major changes in protein composition.

Although we have no direct evidence indicating that the changes in glycoproteins which were observed in *in vitro*-passaged cells are causally related to the acquisition of a malignant phenotype in these cells, the correlation between the expression of these traits and their biological properties suggests that these membrane modifications play an essential role in the expression of malignant phenotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Université des Sciences et Techniques de Lille I, the CNRS, the

MEMBRANE GLYCOPROTEINS IN UROEPITHELIAL CELLS

INSERM (Contract CRE No. 823-029), the MIR (Contract 82-1009), the Polish Academy of Sciences (Grant 10.5), the Neye Foundation, and the Boell Foundation.

REFERENCES

- ALROY, J., SZOKA, F., HEANEY, J.A., and UCCI, A.A., Lectins as a probe for carbohydrate residues in non-neoplastic urothelium of human urinary bladder. *J. Urol.*, **128**, 189-193 (1982).
- BUBENIK, J., KIELER, J., PERLMANN, P., PAULIE, S., KOHO, H., CHRISTENSEN, B., DIENSTBIER, Z., KOPRIVOVA, H., POSPISIL, J., POUCKOVA, P., NOVAK, F., DVORAK, P., LAUEROVA, L., KOVARIK, J., IVERSEN, H.-G., HOU-JENSEN, C., RASMUSSEN, F., BUBENIKOVA, B., JANDLOVA, T., and SIMOVA, J., Monoclonal antibodies against human urinary bladder carcinomas: selectivity and utilization for gamma scintigraphy. *Europ. J. Cancer clin. Oncol.*, **21**, 701-710 (1985).
- CHRISTENSEN, B., KIELER, J., VILJEN, M., CON, P., WANG, C.Y., and WOLF, H., A classification of human urothelial cells propagated *in vitro*. *Anticancer Res.*, **4**, 319-338 (1984).
- DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G., and MONTREUIL, J., Affinity of ten insolubilized lectins towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides. In: T.C. Bøg-Hansen and G.A. Spengler (eds.), *Lectins—biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Vol. 3, pp. 335. de Gruyter, Berlin-New York (1983).
- DUS, D., RADZIKOWSKI, C., DEBRAY, H., MONTREUIL, J., CHRISTENSEN, B., and KIELER, J., Lectin binding to normal, transformed and malignant human uroepithelial cells *in vitro*. In: T.C. Bøg-Hansen and J. Breborowicz (eds.), *Lectin—biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Vol. 4, pp. 65. de Gruyter, Berlin-New York (1985).
- GLICK, M.C., SANTER, U.W., and GILBERT, F.V., Glycoproteins expressed on human tumor cell membranes: In: *13th International Cancer Congress, Part C, Biology of cancer*, Vol. 2, pp. 3-12, Alan R. Liss, New York (1983).
- KIELER, J., Invasiveness of transformed bladder epithelial cells. *Cancer Metast. Rev.*, **3**, 265-296 (1984).
- KOLATA, G.B., Microvilli: a major difference between normal and cancer cells? *Science*, **188**, 819-820 (1975).
- KORNFELD, K., REITMAN, M.L., and KORNFELD, R., The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins: fucose is an important determinant. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6633-6640 (1981).
- MONTREUIL, J., DEBRAY, H., DEBEIRE, P., and DELANNOY, P., Lectins as oligosaccharide receptors. In: H. Popper, W. Reutter, F. Gudat, and E. Köttgen (eds.), *Falk Symposium 34 on structural carbohydrates in the liver*, pp. 239-258, MTP Press, Lancaster (1983).
- MURAMATSU, T., ATKINSON, P.M., and NATHANSON, S.G., Cell-surface glycopeptides: growth-dependent changes in the carbohydrate-peptide linkage region. *J. Mol. Biol.*, **80**, 781-799 (1973).
- NICOLSON, G.L., Cancer metastasis, organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim. biophys. Acta*, **695**, 113-176 (1982).
- OGATA, S.I., MURAMATSU, T., and KOBATA, A., New structural characteristics of the large glycopeptides from transformed cells. *Nature (Lond.)*, **259**, 580-582 (1976).
- OLIVER, G.J.A., and HEMMING, F.W., The transfer of mannose to dolichol phosphate oligosaccharides in pig liver endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, **152**, 191-199 (1975).
- SANTER, U.V., GILBERT, F., and GLICK, M.C., Change in glycosylation of membrane glycoproteins after transfection of NIH3T3 with human tumor DNA. *Cancer Res.*, **44**, 3730-3735 (1984).
- SMETS, L.A., and VAN BEEK, W.P., Carbohydrate of the tumor cell surface. *Biochim. biophys. Acta*, **738**, 237-249 (1984).
- STEELE, J.G., ROWLATT, C., SANDALL, J.K., and FRANKS, L.M., Identification of exposed surface glycoproteins of four human bladder carcinoma cell lines. *Biochim. biophys. Acta*, **732**, 219-228 (1983).
- VILJEN, M., CHRISTENSEN, B., WOLF, H., RASMUSSEN, F., HOU-JENSEN, C., and POVLSEN, C., Comparative studies of normal "spontaneously" transformed and malignant human urothelial cells *in vitro*. *Europ. J. Cancer clin. Oncol.*, **19**, 775-789 (1983).
- WARREN, L., BUCK, C.A., and TUSZYNSKI, G.P., Glycopeptide changes and malignant transformation: a possible role for carbohydrate in malignant behavior. *Biochem. biophys. Acta*, **516**, 97-127 (1978).
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., OHKURA, T., and KOBATA, A., Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3963-3969 (1985).
- YOGESWARAN, G., Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Advanc. Cancer Res.*, **38**, 289-350 (1983).

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus démontrent clairement que les glycoprotéines membranaires de 4 lignées cellulaires HCV-29T, HU609T, HU456 et HU549, tumorigènes chez la souris "nude" et invasives in vitro, propriétés correspondant au degré III de transformation défini par KIELER [285], sont également enrichies en glycannes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétra-antennés avec une diminution concomitante du taux de glycannes biantennés, par rapport aux glycannes présents dans 2 autres lignées cellulaires HCV-29 et HU1734, non-tumorigènes et non-invasives (degré II de transformation).

Il est, d'autre part, significatif qu'après avoir retrouvé la polyantennarisation au niveau des glycannes de la lignée cellulaire HU609 qui nous avait été fournie comme présentant le degré II de transformation, cette lignée, après réexamen à Copenhague, possédait en fait les caractéristiques du degré III de transformation. Le passage spontané du degré II au degré III correspond peut-être à une instabilité phénotypique propre à la lignée en culture.

Mais cette observation illustre bien le fait que l'augmentation du nombre des antennes des glycannes de type N-acétyllactosaminique représente bien un marqueur précoce de la transformation maligne des cellules.

* *
* *

IV - ETUDE COMPAREE DES GLYCANNES MEMBRANAIRES
DE CELLULES DU CARCINOME PULMONAIRE MURIN DE LEWIS (LL₂)
POSSEDANT DES POUVOIRS METASTATIQUES DIFFERENTS

* *
* *

INTRODUCTION.

Afin d'étudier le rôle des glycoconjugués de la surface cellulaire dans le processus de diffusion métastatique, 3 variants cellulaires résistants à l'action toxique de la lectine de germe de Blé ont été sélectionnés : lignées cellulaires LL₂-5, LL₂-8 et LL₂-30 qui possèdent des pouvoirs métastatiques naturel (déterminé par injection sous-cutanée de ces cellules à la Souris) ou expérimental (déterminé par injection intraveineuse), plus faibles que celui des cellules de la lignée mère.

Un autre variant cellulaire résistant à l'action toxique de la lectine d'Aleuria aurantia a également été isolé. Ces cellules présentent un pouvoir métastatique naturel plus faible, mais un pouvoir métastatique expérimental 10 fois supérieur à celui des cellules de la lignée mère.

Enfin, un cinquième variant cellulaire résistant à l'action toxique de la lectine de Ricin (RCA_{II}) présente lui aussi des pouvoirs métastatiques naturel et expérimental réduits, mais possède un pouvoir tumorigène très supérieur à celui des cellules de la lignée mère.

L'étude comparée des N-glycosylpeptides membranaires totaux de ces 5 variants lectine-résistants par rapport aux glycopeptides des cellules de la lignée mère a été réalisée.

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication N°13.

*
* *

PUBLICATION N°13

LECTIN-RESISTANT VARIANTS OF MOUSE LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS.
II-ALTERED GLYCOSYLATION OF MEMBRANE GLYCOPROTEINS.

INVASION AND METASTASIS (1987) (SUBMITTED FOR PUBLICATION).

*
* *

INTRODUCTION

Changes in the expression of cell surface glycoconjugates are well known phenomena that accompany malignant transformation (Smets and Van Beek, 1984 ; Hakomori, 1983).

It has been also found that alterations in cell surface carbohydrates affect the metastatic potential of experimental tumors (Nicolson, 1982 ; Yogeewaran, 1983). But a possible basis for the glycosylation change and its relation to the biological behavior remains still unknown.

Previous studies performed by us on human uroepithelial cell lines of different grades of transformation have shown a direct correlation between the expression of higher-branched N-acetylactosamine-type glycans on the cell surface and the degree of transformation (Debray et al, 1986).

To further investigate this topic, we choose mouse tumor system consisting of Lewis lung carcinoma LL₂ in vitro cell line and five lectin selected variant sublines with altered malignant phenotype. The major characteristics of these tumor cell lines have been described in the accompanying article (Dus et al, manuscript submitted).

The distribution of glycans from N-glycosylproteins in the parental LL₂ line was compared to those of three wheat germ agglutinin resistant (WGA^R) variants as well as those from Ricinus communis agglutinin II resistant (RCAII^R) and Aleuria aurantia agglutinin resistant (AAA^R) variants. Applying a scheme of fractionation with the use of immobilized lectins, as described previously (Debray et al, 1983), we found that mouse lung carcinoma cell lines differing in their metastasibility or tumorigenicity presented quantitative differences in the distribution of N-glycosidically linked glycans that may correlate with their metastatic ability. The possible relevance of these glycosylation changes for the malignant behavior is discussed.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

D-[1-¹⁴C] glucosamine hydrochloride (55 mCi/mM) and D-[6-³H] glucosamine hydrochloride (34 Ci/mM) were obtained from Radiochemical Center (Amersham). Pronase (grade B) was purchased from Calbiochem (La Jolla, USA). Ultrogel ACA 202 was supplied by I.B.F (France). Aqualyte liquid scintillation cocktail was obtained from J.T. Baker Chemicals (Holland). Con A-Sepharose was purchased from Pharmacia (France) and Biogel P₂ (200-400 mesh) from Biorad (France). Lens culinaris agglutinin (LCA) has been purified by affinity chromatography and coupled to Sepharose 4B at a concentration of 2 mg of lectin per ml of gel as previously described (Debray et al., 1983). Fetal bovine serum (FBS), MEM Eagle's and Non-essential amino acids (NEAA) mixture were purchased from Flow (Irvine, Scotland) and dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Serva (Heidelberg, F.R.G.).

Cell lines and cultures conditions

Five variant sublines isolated by lectin selection from mouse Lewis lung carcinoma LL₂ cell line were studied. The origin and isolation of the LL₂ cell line and its lectin resistant variants have been described in the accompanying paper (Dus et al., submitted for publication). The main characteristics of these lines are presented in Table I.

Cells were grown as monolayers in tissue culture grade plastic flasks at 37° C in a 5 % CO₂/90 % air humidified atmosphere. The growth medium was MEM Eagle's containing 10 % fetal calf serum, NEAA and 2 mM glutamine. Cells for experiments were harvested by mechanical means without use of proteases. Staining with Hoechst 33258 fluorochrome showed all cell lines to be free of Mycoplasma contamination (Chen., 1977).

The cells were stored in 10 % DMSO/90 % complete medium in liquid nitrogen and were replaced with a low passage sample from the

frozen stock every two months.

Radioactive labeling of cells

Exponentially growing cells were labeled metabolically with \underline{D} -[6- ^3H] or \underline{D} -[1- ^{14}C] glucosamine hydrochloride (62.5 μCi and 12.5 $\mu\text{Ci}/75$ sq. cm Falcon flask, respectively) in fresh complete medium. After 48 hr, monolayer cell cultures were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested into PBS by gentle scraping and centrifugation.

Preparation of cellular glycopeptides

Cell pellets were delipidated according to the procedure of Oliver and Hemming (1975). Delipidated material was exhaustively digested for 72 hr with pronase according to Muramatsu et al. (1973). Up to this point, cellular material from each cell line was treated separately. Then, for comparative analysis [^3H]-labeled glycopeptides from one of the cell lines were mixed with [^{14}C]-labeled glycopeptides from the other cell line and co-fractionated.

Fractionation of cellular glycopeptides

Gel filtration of Ultrogel ACA 202 and subsequent affinity chromatography of glycopeptides on Con A-Sepharose and LCA-Sepharose were performed as described previously (Debray et al., 1986).

RESULTS

Differentially [^3H] or [^{14}C] labeled total cellular glycopeptides from the following pairs of Lewis lung carcinoma cell lines were co-chromatographed on Ultrogel ACA 202 : $\text{LL}_2 + \text{LL}_25$, $\text{LL}_2 + \text{LL}_28$, $\text{LL}_2 + \text{LL}_230$, $\text{LL}_2 + \text{LL}_2\text{RCA II}$ and $\text{LL}_2 + \text{LL}_2\text{AAA}$. Two major fractions F1 and F2 were collected. Typical elution profiles of co-fractionation of $\text{LL}_2 + \text{LL}_2$ lectin resistant variant cell glycopeptides are shown in Figure 1. The material eluted in the void volume contained proteoglycans and large glycopeptides with O-glycosidically linked glycans and was not subjected to further analysis. However, the percentage of total radioactivity associated with this fraction in the parental line was higher than in the lectin resistant cell variants.

The second fraction F2 contained N-glycosylpeptides and LL_2 parental line contained less material eluted in this fraction than its lectin resistant variants. In this fraction, three different elution zones can be distinguished : - a fast eluting N-glycosylpeptide zone with apparent high molecular weight (fractions 40 to 50, Fig. 1), corresponding to tri- and tetraantennary or even more complex N-acetyllactosamine type glycopeptides ; - an intermediate zone (fractions 51 to 80, Fig. 1), corresponding to biantennary N-glycopeptides with lower molecular weight, and - a low molecular weight N-glycopeptide zone (fractions 81 to 110, Fig. 1) corresponding mainly to glycopeptides of the oligomannosidic type or to immature N-acetyl-lactosamine type glycopeptides.

After co-fractionation of LL_2 and LL_2AAA cell glycopeptides on Ultrogel ACA 202, no significant variation was found associated with the F2 fraction (panel A of Fig. 1). But when LL_2 and LL_25 or LL_28 glycopeptides were co-fractionated on Ultrogel, the WGA^{R} variants contained more glycopeptides eluted from the column as a biantennary N-acetyllactosamine type glycopeptides than the parental line with a concomitant decrease in the higher molecular weight glycopeptides (Panel B. of Fig. 1). No significant variation was found associated with the lower molecular weight oligomannosidic type glycopeptides. Co-fractionation of LL_2 and LL_230 or $\text{LL}_2\text{RCA II}$ cell glycopeptides

revealed that those lectin resistant variants contained more glycopeptides eluted from the column as low molecular weight glycopeptides with a concomitant decrease in the higher molecular weight glycopeptides (Panel C and D of Fig. 1).

Radioactive glucosamine-labeled glycopeptides from fraction F2 were co-fractionated by affinity chromatography on Con A- and subsequently on LCA-Sepharose. The results, expressed as the percentage of total radioactivity recovered after Ultrogel ACA 202 gel filtration in fraction F2, are summarized in Table II.

Knowing the basis for interactions between Con A and glycopeptides (Debray et al, 1983 ; Kornfeld et al, 1981) it was possible to divide the analysed cell lines into three groups. The first group was represented by LL₂5 and LL₂8 variants. Both lines contained more biantennary glycans of N-acetyllactosamine type (FE-C 0.01 M) and less tri- and tetraantennary and more complex glycans or biantennary glycans with a bisecting GlcNAc residue (FNR-C) than the parental cell line. The percentage of oligomannosidic glycopeptides (FE-C 0.3 M) do not vary significantly.

The second group, consisting of LL₂30 and LL₂RCA II variants contained more oligomannosidic type glycopeptides, immature biantennary N-acetyllactosamine type or hybrid type glycopeptides strongly reacting with immobilized Con A (FE-C 0.3 M) than the remaining cell variants. This increase is associated with a concomitant decrease of the percentage of highly branched N-acetyllactosamine type glycopeptides (FNR-C) and even more simpler biantennary N-acetyllactosamine type glycopeptides (FE-C 0.01 M).

In the third group, the LL₂AAA variant contained just slightly less amount of biantennary N-acetyllactosamine type glycopeptides (FE-C 0.01 M) and slightly more of complex N-acetyllactosamine type glycopeptides (FNR-C) and oligomannosidic type glycans (FE-C 0.3 M) than the parental line.

Re-fractionation of the FNR-C on LCA-Sepharose revealed that comparable amount of glycopeptides from all cell lines examined were bound (FNR-C FE-L from 0.10 to 2.60 %). They are either biantennary

glycans with a bisecting β -GlcNAc residue that possess an α -L fucose residue linked in C-6 position to the N-acetylglucosamine in the GlcNAc-Asn linkage (Debray et al, 1983 ; Kornfeld et al., 1981), or triantennary glycopeptides with one of the α -linked mannose residue substituted at position C-2 and C-6 which also possess an α -1,6-linked fucose residue (Kornfeld et al., 1981) or unsialylated tetraantennary glycopeptides with this α -1,6-linked fucose (Samor et al, 1986).

Comparable amounts of the FE-C 0.01 M glycopeptide fractions from LL₂ parental line and LL₂8, LL₂RCA II or LL₂30 were also bound to immobilized LCA (FE-C 0.01 M FE-L, from 12 to 16 %). They contained biantennary glycans possessing an α -L fucose residue involved in the GlcNAc-Asn linkage. However, LL₂5 line contained more of these fucosylated biantennary glycans (20%) and LL₂AAA variant contained less of such glycans (10 %).

Similarly, comparable amounts of the FE-C 0.3 M glycopeptide fractions from parental line, LL₂5, LL₂8 and LL₂AAA lines were bound to immobilized LCA (FE-C 0.3 M FE-L, from 0.5 to 2.6 %). They represented either immature biantennary glycans with an α -1,6-linked fucose involved in the GlcNAc-Asn linkage (Debray et al., 1983) or hybrid type glycopeptides with this fucose residue (Hughes and Feeny, 1986). However, LL₂RCA II and LL₂30 lines contained a higher amount of these fucosylated glycans (16,5 and 12 %, respectively).

DISCUSSION

Comparative studies of three different WGA-resistant variants as well as RCA II-resistant and AAA-resistant variants of Lewis lung carcinoma cell line and the parental LL₂ cell line revealed for four of them significant quantitative differences in their total cellular glycopeptides.

As shown by combined gel filtration analysis and sequential affinity chromatography on immobilized Con A and LCA, the three WGA-resistant variants LL₂5, LL₂8 and LL₂30 contained significantly less of the large-size glycans. LL₂5 and LL₂8 lines showed a relative but marked increase in the amount of biantennary glycans with a parallel decrease in the amount of tri- and tetraantennary glycans. No significant variation was found in the strongly Con A-reactive oligomannosidic type, immature biantennary N-acetylglucosamine type or hybrid type glycans. LL₂30 variant line (WGA-resistant) contained more of these strongly Con A-reactive glycans associated with significant decrease of Con A-non reactive tri- and tetraantennary glycans and even of more simpler Con A-weakly reactive biantennary N-acetylglucosamine type glycans.

From these results we can postulate that the three WGA-resistant LL₂ cell variants which fail to synthesize more complex N-acetylglucosamine type glycans are deficient in some specific N-acetylglucosaminyltransferases. Robertson et al (1978) have demonstrated that a WGA-resistant mutant of CHO cells with an altered GlcNAc transferase I activity produced glycoproteins containing (Man)₅-(GlcNAc)₂ glycans and a reduced amount of complex N-acetylglucosamine chains as compared to wild type cell glycoproteins.

The RCA II-resistant variant showed also a significant decrease in Con A-non reactive tri- and tetraantennary glycans with a parallel increase in the amount of Con A-strongly reactive glycans ; half of them represented (α 1-6)-fucosylated either immature biantennary N-acetylglucosamine type, or hybrid type glycans according to their binding to immobilized LCA-Sepharose. We can postulate that the RCA II-resistant variant which also fails to synthesize complex

N-acetyllactosamine type glycans and accumulates in cellular glycoproteins either hybrid or oligomannosidic type glycans possess the same deficiency in either GlcNAc transferase II or in terminal processing glycosidase, mannosidase II as was recently demonstrated in some ricin-resistant BHK cell lines by Hughes et al. (1986).

However, from the chromatographic behavior of glycopeptides obtained from the AAA-resistant variant on immobilized Con A and LCA, which was very similar to that observed with N-glycopeptides from the parent cell line, we do not know yet what can be the enzymatic basis for Aleuria aurantia agglutinin resistance.

Analysis by 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of N-glycopeptides obtained from this AAA-resistant variant as well as from the WGA-resistant and RCA II-resistant variants is now in progress to determine, by identification of accumulating glycans from cellular glycoproteins, the biochemical features of their resistance.

All examined lectin resistant variants exhibited lowered spontaneous metastasibility and at least for the three WGA-resistant and the RCA II-resistant variant this reduced spontaneous as well as experimental metastasibility can be correlated with a simplification of cell surface N-glycosidically linked glycans. The nonmetastasizing lectin resistant variants possessed less highly branched tri- and tetraantennary N-acetyllactosamine type glycans with either simultaneous increase in the amount of biantennary glycans (LL₂5 and LL₂8) or in oligomannosidic and/or hybrid-type glycans (LL₂30 and LL₂ RCA II).

The simplification of the N-acetyllactosamine type glycans can be also associated with a reduction of sialic acid content, as reported by Finne et al. (1980) who showed that in vitro selected WGA-resistant melanoma B16 variants with decreased sialic acid content presented decreased tumorigenicity and metastatic capacity. Yogeewaran and Salk (1981) on the basis of similar findings proposed that sialic acid on the cell surface may play a role in tumor cell metastasibility.

Studies of DENNIS et al. (1986) have revealed that the high metastatic mouse lymphoma cell line MDAY-D₂ expressed sialylated Asn-linked complex oligosaccharides containing polylactosamine structures, whereas the non-metastatic WGA^R mutant, MDW4, synthesized prematurely truncated oligosaccharides lacking terminal galactose and sialic acid residues.

Recently, the same group (DENNIS et al. 1987) described a deficiency in tri- and tetraantennary N-acetyllactosamine-type glycans, due to a decrease of (β1-6)GlcNAc transferase V, in non-metastatic L-PHA^R mutant of MDAY-D₂ cells.

It is noteworthy that the AAA-resistant variant which also exhibited lowered spontaneous metastasibility but possessed high lung colonizing ability after intravenous administration (experimental metastasis), does not present this decrease in highly branched N-acetyllactosamine type glycans when compared to the parental line. This variant would be important in searching for specific glycans that may be involved in the target organ colonization step of metastatic process. It can be also presented as a further evidence that cell surface glycoconjugates are involved in blood-borne metastatic colonization.

Based on the results presented here and from our previous studies on differences in glycosylation between human uroepithelial cell lines with different transformation grades (Debray et al., 1986) we conclude that cell surface carbohydrate changes take place during sequential tumor progression. Selection of lectin resistant variants with changed malignant phenotype leads to altered pattern of glycosylation and a decrease in the content of branched, complex glycans in cellular glycoproteins. The question, if these changes are directly connected with the particular steps of tumor progression still remains unanswered.

REFERENCES



Chen, T.R. : In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoeschst 33258 stain. *Exp. Cell Res.*, 104, 255-262 (1977).

Debray, H., Pierce-Cretel, A., Spik, G. and Montreuil, J. : Affinity of ten insolubilized lectins towards glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides. In : T.C. Bøg-Hansen and G.A. Spengler (eds), *Lectins - Biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Vol. 3, pp. 335-350, de Gruyter, Berlin - New York (1983).

Debray, H., Qin, Z., Delannoy, P., Montreuil, J., Dus, D., Radzikowski, C., Christensen, B. and Kieler, J. : Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines, *Int. J. Cancer*, 37, 607-611 (1986).

Dennis, J.W., Laferte, S., Fukuda, M., Dell, A. and Carver, J.P., : Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants with varying metastatic potential. *Eur. J. Biochem.*, 161, 359-373 (1986).

Dennis, J.W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M.L. and Kerbel, R.S. : β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*, 236, 582-585 (1987).

Dus, D., Debray; H., Strzadala, L., Rak, J., Kusnierczyk, H., Montreuil, J. and Radzikowski, C. : Lectin resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. I. Selection and in vivo properties. (submitted for publication).

Finne, J., Tao, T.W. and Burger M.M. : Carbohydrate changes in glycoproteins of a poorly metastasizing wheat germ agglutinin-resistant melanoma clone. *Cancer Res.*, 40, 2580-2587 (1980).

Hakomori, S. and Kannagi, R. : Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71, 231-251 (1983).

Hughes, R.C. and Feeney, J. : Ricin-resistant mutants of baby-Hamster kidney cells deficient in α -mannosidase II-catalyzed processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 158, 227-237 (1986).

Kornfeld, K., Reitman, M.L. and Kornfeld, R. : The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins : Fucose is an important determinant. *J. Biol. Chem.*, 256, 6633-6640 (1981).

Muramatsu, T., Atkinson, P.M., Nathenson, S.G. and Ceccarini, C. : Cell-surface glycopeptides : growth-dependent changes in the carbohydrate-peptide linkage region. *J. Mol. Biol.*, 80, 781-799 (1973).

Nicolson, G.L. : Cancer metastasis, organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 695, 113-176 (1982).

Oliver, G.J.A. and Hemming, F.W. : The transfer of mannose to dolichol phosphate oligosaccharides in pig liver endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 152, 191-199 (1975).

Robertson, M.A., Etchinson, J.R., Robertson, J.S., Summers, D.F. and Stanley, P. : Differential involvement of cell surface sialic acid residues in wheat germ agglutinin binding to parental and wheat germ agglutinin-resistant chinese Hamster ovary cells. *Cell*, 13, 515-526 (1978).

Samor, B., Michalski, J.C., Debray, H., Mazurier, C., Goudemand, M., Van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G. and Montreuil J. : Primary structure of a new tetraantennary glycan of the N-acetyllactosaminic type isolated from human factor VIII/Von Willebrand factor. *Eur. J. Biochem.*, 158, 295-298 (1986).

Smets, L.A. and Van Beek, W.P. : Carbohydrate of the tumor cell surface. *Biochim. Biophys. Acta*, 738, 237-249 (1984).

Yogeeswaran, G. : Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv. Cancer Res.*, 38, 289-350 (1983).

Yogeeswaran, G. and Salk, P.L. : Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science*, 212, 1514-1516 (1981).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, the CNRS, the INSERM (contract CRE N°823-029), the MIR (contract 82-1009) and the Polish Academy of Sciences (Grant CPBP 06.01).

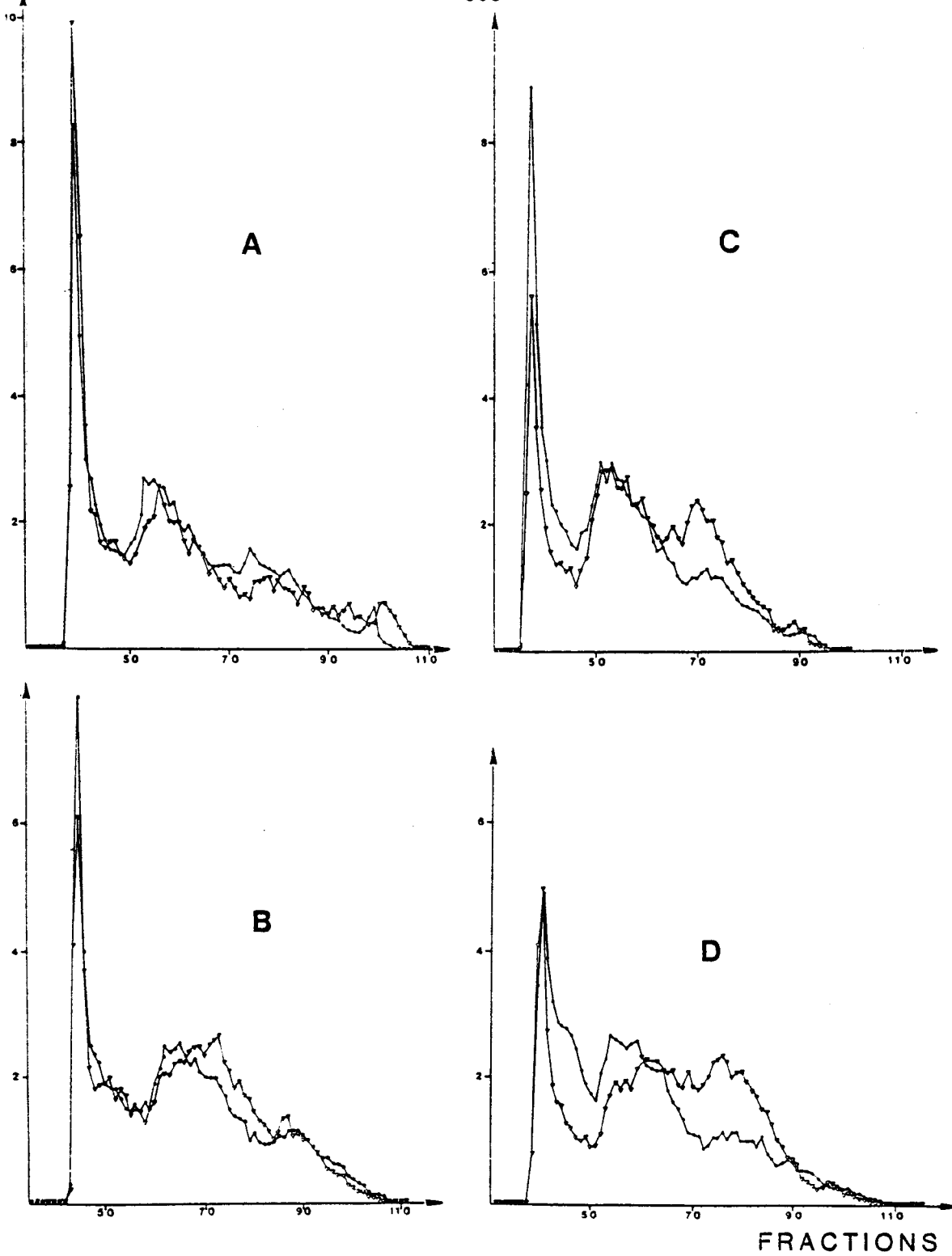


Fig. 1. Elution profiles of total cellular glycopeptides co-fractionated on Ultrogel ACA 202 from : (●), LL₂ parental line and (▽), lectin-resistant LL₂. Panel A : LL₂ AAA^R cells ; panel B : LL₂ 5 (WGA^R) cells ; panel C : LL₂ 30 (WGA^R) cells ; panel D : LL₂ RCA_{II}^R cells.

TABLE I

RELATIVE DIFFERENCES IN TUMORIGENIC AND METASTATIC PROPERTIES OF LL₂ LECTIN
RESISTANT VARIANTS AS COMPARED TO THE PARENTAL CELLS^a (DUS et al [1987]).

Cells	Local tumor weight, g	Spontaneous metastasis		Experimental metastasis	
		rate ^b	potential ^c	rate ^b	potential ^c
LL ₂ parental	1	1	1	1	1
LL ₂ ⁵ (WGA ^R)	0.7	0.03	0.1	0.08	0.7
LL ₂ ⁸ (WGA ^R)	0.7	0.01	0.08	0.05	0.4
LL ₂ ³⁰ (WGA ^R)	1.3	0.1	0.6	0.04	0.3
LL ₂ (AAA ^R)	1	0.08	0.3	4.1	1
LL ₂ (RCA II ^R)	2.5	0.01	0.07	0.02	0.6

^a the differences between variant and parental cells were estimated according to equation :

$$x = \frac{\text{Value for variant cells}}{\text{Value for parental cells}}$$

^b relative number of metastatic foci per lung.

^c relative percent of mice with metastases.

TABLE II

Relative proportions of the two glycopeptide fractions obtained by gel filtration of radiolabeled total cellular glycopeptides on Ultrogel ACA 202 column. Values of each fraction are given as a percentage of total radioactivity recovered.

Cell line	Fraction	
	1	2
LL ₂ parental line	22.5	77.5
LL ₂ ⁵ (WGA ^R)	18.2	81.8
LL ₂ parental line	19.0	81.0
LL ₂ ⁸ (WGA ^R)	17.8	82.2
LL ₂ parental line	26.3	73.7
LL ₂ ³⁰ (WGA ^R)	17.8	82.2
LL ₂ parental line	24.8	75.2
LL ₂ (RCA II ^R)	18.8	81.20
LL ₂ parental line	26.0	74.0
LL ₂ (AAA ^R)	24.6	75.4

Fraction 1 : Proteoglycans and large glycopeptides with
O-glycosidically linked glycans.

Fraction 2 : N-acetyllactosamine-type, oligomannosidic-type or
hybrid-type N-glycosylpeptides.

TABLE III

Affinity chromatography of D-glucosamine radiolabeled glycopeptides from Fraction 2 obtained by gel filtration on Ultrogel ACA 202 on Con A-Sepharose (S-Con A) and LCA-Sepharose (S-LCA). Values for each fraction are given as a percentage of total radioactivity recovered after Ultrogel ACA 202 gel filtration in fraction 2.

Cell line	% of total radioactivity						
	S-Con A	FNR-C		FE-C 0.01M		FE-C 0.3M	
LL ₂ parental line		54.4		15.3		7.8	
LL ₂ 5 (WGA ^R)		45.8		28.5		7.5	
LL ₂ parental line		57.0		16.5		7.5	
LL ₂ 8 (WGA ^R)		49.2		24.1		8.9	
LL ₂ parental line		50.0		15.2		8.5	
LL ₂ 30 (WGA ^R)		39.1		17.0		26.1	
LL ₂ parental line		47.8		19.2		8.2	
LL ₂ (RCA II ^R)		28.3		19.4		33.5	
LL ₂ parental line		50.0		16.0		8.0	
LL ₂ (AAA ^R)		51.9		12.7		10.8	
	S-LCA	FNR-C FNR-L	FNR-C FE-L	FE-C 0.01M FNR-L	FE-C 0.01M FE-L	FE-C 0.3M FNR-L	FE-C 0.3M FE-L
LL ₂ parental line		51.7	2.7	3.1	12.2	6.7	1.2
LL ₂ 5 (WGA ^R)		45.7	0.1	8.9	19.6	6.7	0.8
LL ₂ parental line		55.0	2.0	3.5	13.0	6.8	0.7
LL ₂ 8 (WGA ^R)		46.7	2.5	8.2	15.9	7.2	1.7
LL ₂ parental line		49.0	1.0	3.0	12.2	7.2	1.3
LL ₂ 30 (WGA ^R)		38.5	0.6	3.7	13.3	14.1	12.0
LL ₂ parental line		47.1	0.7	4.5	14.7	7.2	1.0
LL ₂ (RCA II ^R)		26.7	1.6	3.1	16.3	17.0	16.5
LL ₂ parental line		49.0	1.0	3.0	13.0	7.0	1.0
LL ₂ (AAA ^R)		50.7	1.2	2.9	9.8	8.1	2.7

FNR-C : Fraction not retained on a Con-A-Sepharose column ; FE-C 0.01 M : fraction eluted from a Con-A-Sepharose column with 0.01 M α MG ; FE-C 0.3M : fraction eluted from a Con-A-Sepharose column with 0.3M α MG ; FNR-C FNR-L fraction non retained on a Con-A and LCA-Sepharose columns ; FNR-C FE-L : fraction non retained on Con-A-Sepharose and eluted from LCA-Sepharose ; FE-C 0.01M FNR-L : fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.01M α MG and not retained on LCA-Sepharose ; FE-C 0.01M FE-L : fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.01M α MG and eluted from LCA-Sepharose ; FE-C 0.3M FNR-L : fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.3M α MG and not retained on LCA-Sepharose ; FE-C 0.03M FE-L : fraction eluted from Con-A-Sepharose with 0.3M α MG and eluted from LCA-Sepharose.

CONCLUSIONS

L'étude comparée des N-glycosylpeptides membranaires totaux de 3 variants cellulaires résistants à l'action de la lectine de germe de Blé (LL₂-5, LL₂-8 et LL₂-30), d'un variant cellulaire résistant à l'action de la lectine de Ricin RCA_{II} et d'un variant cellulaire résistant à l'action toxique de la lectine d'Aleuria aurantia, sélectionnés à partir de cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis (LL₂) et possédant des pouvoirs métastatiques différents par rapport à celui des cellules de la lignée mère, révèle des différences significatives au niveau de l'expression des N-glycosylpeptides membranaires.

Les 3 variants WGA-résistants, aux pouvoirs métastatiques naturel et expérimental réduits renferment beaucoup moins de glycanes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés que les cellules de la lignée mère, avec chez les variants LL₂-5 et LL₂-8, une augmentation parallèle du taux de glycanes biantennés, mais sans modification significative du taux des glycanes de type oligomannosidique.

Par contre, le 3ème variant WGA-résistant LL₂-30 présente une augmentation considérable du taux des structures oligomannosidiques ou mixtes, associée à une diminution importante du taux des glycanes tri- et tétraantennés ainsi qu'à une légère diminution de la quantité de structures biantennées.

Le variant cellulaire AAA-résistant, au pouvoir métastatique naturel réduit, mais présentant un pouvoir métastatique expérimental 10 fois plus élevé que celui des cellules de la lignée mère, semble posséder les mêmes structures glycaniques que les cellules de la lignée mère.

L'étude des fractions glycaniques obtenues à partir de 10⁹ cellules AAA-résistantes est en cours afin de déterminer la nature de la résistance à l'action toxique de la lectine d'Aleuria aurantia.

Nos résultats montrent que pour 4 des variants lectine-résistants (LL₂-5, LL₂-8, LL₂-30 et LL₂-RCA_{II}), une diminution des pouvoirs métastatiques à la fois naturel et expérimental va de pair avec une

simplification apparente des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires. Ces variants possèdent moins de glycanes tri- et tétraantennés avec une augmentation parallèle des glycanes biantennés (LL₂-5, LL₂-8) ou des glycanes oligomannosidiques, mixtes ou biantennés immatures (LL₂-30 et LL₂-RCA_{II}).

Le variant AAA-résistant ne présente pas de modifications glycaniques bien que son pouvoir métastatique naturel soit également considérablement diminué. L'augmentation du pouvoir métastatique expérimental de cette lignée peut cependant être associée à l'expression d'autres glycanes spécifiques dont la caractérisation est en cours.

* *
* *

CONCLUSIONS GENERALES

* *
* *

Grâce aux nombreuses structures glucidiques dont nous disposons au laboratoire, nous avons pu préciser la spécificité fine d'un grand nombre de lectines et cela nous a permis de développer un procédé général de fractionnement de N-glycosylpeptides d'origines diverses qui associe à la chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées, les procédés plus classiques de tamisage moléculaire et la HPLC d'échange d'ions et de partage.

Grâce à l'utilisation de marqueurs radioactifs, ce procédé miniaturisé nous a permis d'aborder l'étude des modifications des glycannes des N-glycosylprotéines membranaires associées à la transformation maligne des cellules et à la diffusion métastatique.

Des études comparées ont été menées sur les modèles expérimentaux suivants :

- membranes plasmiques isolées de foie de rat sain et hépatomateux ;
- fibroblastes de rein de Hamster (BHK21/C13/8) normaux et transformés par le virus du sarcome de Hamster (BHK21/C13/8/HS5), fournis par le Professeur L. MONTAGNIER ;
- cellules uro-épithéliales humaines normales et cancéreuses (travail effectué en collaboration avec le Docteur D. DUS, Hirszfeld Institute of Immunology de Wroclaw, Pologne et The Fibiger Institut de Copenhague, Danemark) ;
- cellules LL₂ du carcinome pulmonaire murin de Lewis, sélectionnées par leur résistance à l'action toxique de diverses lectines et possédant des pouvoirs métastatiques différents (travail effectué en collaboration avec le Docteur D. DUS, Hirszfeld Institute of Immunology de Wroclaw).

Le résultat capital que nous avons obtenu, simultanément avec les laboratoires de L. WARREN (USA), SMETS (Hollande) et KOBATA (Japon), concerne l'inversion des proportions : structures biantennées/structures tri- et tétraantennées dans les cellules transformées, au profit

des structures "polyantennées" et au détriment des structures biantennées.

Ces transformations s'accompagnent, tout au moins dans le modèle fibroblastes BHK21/C13, d'une augmentation du taux de sialylation des glycanes.

La polyantennarisation des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires semble donc bien constituer un marqueur de la transformation maligne des cellules et la connaissance que nous possédons à présent de la conformation spatiale des glycanes nous permet de poser en hypothèse que cette polyantennarisation associée à une sialylation accrue des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires et des fibronectines en particulier, pourraient compter parmi les facteurs de dissociation spontanée du tissu cancéreux, prélude à la diffusion métastatique.

Un autre résultats important à cet égard, concerne l'observation montrant que le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses est lui-même modulé par l'expression de glycanes différents à la surface cellulaire.

La polyantennarisation associée à une sialylation accrue des glycanes membranaires seraient en relation avec les comportements suivants, particuliers à la cellule cancéreuse :

- augmentation de l'électronégativité des cellules cancéreuses, par augmentation du nombre d'antennes porteuses de résidus terminaux d'acide sialique ;
- modification de la perméabilité membranaire liée à l'accentuation du caractère hydrophile des glycoprotéines membranaires due à l'augmentation du nombre de groupements OH et COO⁻ ;
- dissociation tissulaire conduisant à la métastase, facilitée par une perte d'adhésivité des cellules liée d'une part à la transformation des glycanes des fibronectines ainsi qu'à celle des glycanes des glycoprotéines

membranaires, perturbant ainsi les systèmes lectiniques d'adhésion cellulaire ;

- résistance et protection des cellules cancéreuses en général et des cellules métastasantes en particulier par les glycanes polyantennés adoptant la conformation étalée dite en "parapluie", jouant le rôle de boucliers vis-à-vis des protéines membranaires qu'elles masquent et permettant d'expliquer pourquoi ces cellules défont le système de défense immunitaire de l'hôte ;

- explication possible du phénomène de métastase par reconnaissance des nouvelles structures glycaniques multiantennées par les lectines membranaires des tissus sains colonisés.

Par contre, notre méthode de fractionnement ne nous a pas, jusqu'à présent, permis de caractériser de nouvelles structures glycaniques représentant des antigènes spécifiques de la cellule cancéreuse. Cependant, grâce à l'utilisation de nouvelles lectines immobilisées, encore plus spécifiques et avec l'aide de la spectroscopie ^1H -RMN à 400 MHz, nous ne désespérons pas d'identifier de tels antigènes glycaniques à la surface des cellules cancéreuses ; ceci permettrait d'envisager, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces antigènes spécifiques, le ciblage de drogues cytotoxiques vers les cellules cancéreuses.

L'observation d'une biosynthèse préférentielle de structures tri- et tétraantennées pose également le problème de la nature et de l'origine de ces déviations métaboliques. La Biologie Moléculaire peut permettre de résoudre ces problèmes ; ceci implique par exemple le clonage des gènes des glycosyltransférases incriminées dans cette glycosylation aberrante, à partir des cellules transformées et leur transfert dans des cellules normales.

La transfection de cellules normales avec différents oncogènes permettrait également d'aborder le problème du contrôle génétique ou épigénétique de ces glycosyltransférases. D'autre part, ces modèles cellulaires permettraient d'établir des relations entre l'expression de certains glycanes à la surface cellulaire et l'acquisition de

propriétés biologiques nouvelles des cellules transfectées, en particulier, en ce qui concerne la modulation du potentiel métastatique des cellules.

Enfin, le modèle expérimental constitué par les différents variants cellulaires lectine-résistants du carcinome pulmonaire murin de Lewis, va nous permettre de disséquer les principales étapes du processus de diffusion métastatique et, en particulier, la première étape constituée par l'adhésion des cellules tumorales aux membranes basales des cellules endothéliales ainsi que le processus final de colonisation du parenchyme pulmonaire par les cellules tout en nous permettant de dégager le rôle joué par les glycanes membranaires au cours de ces différentes étapes.

Ce modèle cellulaire permet en effet, l'expérimentation à la fois in vivo et in vitro. Ainsi, l'action de certaines drogues telles que des inhibiteurs de la glycosylation in vitro pourra être suivie de l'étude des modifications du pouvoir métastatique après injection des cellules à la souris. L'établissement de corrélations entre l'expression de nouvelles structures glycaniques à la surface cellulaire et la modulation du pouvoir métastatique des cellules cancéreuses sera ainsi abordée.

*
* *

BIBLIOGRAPHIE

*
* *

A	N° référence	Pages
ABERCROMBIE M., AMBROSE J.E. (1962) Cancer Res., <u>22</u> , 525-548.	2	7
ABERCROMBIE M., HEAYSMAN J.E.M. (1954) Exp. Cell Res., <u>6</u> , 293-306.	194	58
ABERCROMBIE M., HEAYSMAN J.E.M., PEGRUM S.M. (1970) Exp. Cell Res., <u>60</u> , 437-444.	195	58
ACHORD D.T., BROTH F.F., GONZALEZ-NORIEGA A., SLY W.S., STAHL P. (1977) Pediatric Res., <u>11</u> , 816-822.	163	54
AKABORI S., OHNO K., NARITA K. (1952) Bull. Chem. Soc. Japon, <u>25</u> , 214.	298	222
AKASAKI M., KAWASAKI T., YAMASHINA I. (1975) FEBS Lett., <u>59</u> , 100-104.	260	81
ALITALO K., VAHERI A. (1982) Adv. Cancer Res., <u>37</u> , 11-158.	264	85
APLIN J.D., HUGHES R.C. (1982) Biochim. Biophys. Acta, <u>694</u> , 375-418.	38	18-19-20
ASHALL F. (1986) Trends Biochem. Sci., <u>11</u> , 518-520	24	13
ATKINSON M.A.L., BRAMWELL M.E. (1980) J. Cell Sci., <u>46</u> , 187-201.	231	72
ATKINSON M.A.L., BRAMWELL M.E. (1980) J. Cell Sci., <u>46</u> , 203-220.	232	72
ATKINSON P.H., HAKIMI J. (1980) In : "Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans", ed. W.J. LENNARZ, Plenum New-York, p. 191-239.	223	66

	N°référence	Pages
AUB J.C., SANFORD B.H., COTE M.N. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>54</u> , 396-399.	6	7-82
B		
BAENZIGER J.U., NATOWICZ M. (1981) Anal. Biochem., <u>112</u> , 357-361.	303	224
BALLOU C.E., (1976) Adv. Microb. Physiol., <u>14</u> , 93-158.	68	28
BALLOU L., COHEN R.E., BALLOU C.E. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 5986-5991.	59	24
BARONDES S.H. (1981) Ann. Rev. Biochem., <u>50</u> , 207-231.	151	51
BARONDES S.H. (1984) Science, <u>223</u> , 1259-1264.	180	55
BAYARD B., MONTREUIL J. (1974) In : "Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués", MONTREUIL J. (ed), Editions du CNRS, Paris, p. 208-218.	300	222
BENEDETTI E.L., EMMELOT P. (1967) J. Cell Sci., <u>2</u> , 499-512.	13	10-11
BENNET V. (1985) Ann. Rev. Biochem., <u>54</u> , 273-304.	18	13
BERGER E.G., BUDDECKE E., KAMERLING J.P., KOBATA A., PAULSON J.C., VLIAGENTHART J.F.G. (1982) Experientia, <u>38</u> , 1129-1258.	122	46
BERRIDGE M.J., IRVINE R.F. (1984) Nature, <u>312</u> , 315-321.	25	16

	N°référence	Pages
BEYER T.A., SADLER J.E., REARICK J.I., PAULSON J.C., HILL R.L. (1981) Adv. Enzymol., <u>52</u> , 23-175.	70	28
BHAVANANDAN V.P., KATLIC A.W. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 4000-4008.	290	95
BLAKE D.A., GOLDSTEIN I.J. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 5387-5393.	78	30
BLITHE D.L., BUCK C.A., WARREN L. (1980) Biochemistry, <u>19</u> , 3386-3395.	239	73-279
BOCK K., ARNAP J., LONNGREN J. (1982) Eur. J. Biochem., <u>129</u> , 171-178.	102	36
BONNER W.D. (1955) Methods Enzymol., <u>1</u> , 722-729.	281	92
BRACKENBURY R., THIERY J.P., RUTISHAUSER U., EDELMAN G.M. (1977) J. Biol. Chem., <u>252</u> , 6835-6840.	188	57
BRANDLEY B.K., SCHNAAR R.L. (1986) J. Leukocyte Biol., <u>40</u> , 97-111.	155	53
BREMER E.G., HAKOMORI S., BOWEN-POPE D.F., RAINES E., ROSS R. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 6818-6825.	206	60
BRETCHER M.S., RAFF M.C. (1975) Nature, <u>258</u> , 43-49.	39	20
BRILES E.B. (1982) Int. Rev. Cytol., <u>75</u> , 101-165.	130	47
BRISSON J.R., CARVER J.P. (1983) Biochemistry, <u>22</u> , 3680-3686.	98	36

	N°référence	Pages
BRISSON J.R., CARVER J.P. (1983) Can. J. Biochem. Cell Biol., <u>61</u> , 1067-1078.	99	36
BUCK C.A., FUHRER J.P., SOSLAU G., WARREN L. (1974) J. Biol. Chem., <u>249</u> , 1541-1550.	230	72
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. (1970) Biochemistry, <u>9</u> , 4567-4576.	228	70-71
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. (1971) Biochemistry, <u>10</u> , 2176-2180.	237	73
BURGER M.M., GOLDBERG A.R. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>57</u> , 359-366.	7	7
BURGER M.M., NOONAN K.D. (1970) Nature, <u>228</u> , 512-515.	201	59
BURKE D., MENDONCA-PREVIATO L., BALLOU C.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>77</u> , 318-322.	158	53
BUTLER W.T., CUNNINGHAM L.W. (1966) J. Biol. Chem., <u>241</u> , 3882-3888.	65	26
BUTTERS T.D., DEVALIA V., APLIN J.C., HUGHES R.C. (1980) J. Cell Sci., <u>44</u> , 33-58.	185	56
BUTTERS T.D., HUGHES R.C. (1981) Biochim. Biophys. Acta, <u>640</u> , 655-671.	71	28-29
C		
CARTER W.G., HAKOMORI S. (1979) Biochemistry, <u>18</u> , 730-738.	86	32

	N°référence	Pages
CECCARINI C., MURAMATSU T., TSANG J., ATKINSON P.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>72</u> , 3139-3143.	198	58-75
CERRA R.F., HAYWOOD-REYD P.L., BARONDES S.H. (1984) J. Cell Biol., <u>98</u> , 1580-1589.	181	56
CHANDRASEKARAN E.V., DAVILA M., NIXON D.W., GOLDFARB M., MENDICINO J. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 7213-7222.	249	79
CHANDRASEKARAN E.L., DAVILA M., NIXON D., MENDICINO J. (1984) Cancer Res., <u>44</u> , 1557-1567.	251	79
CHEN W., SINGER S.J. (1982) J. Cell Biol., <u>93</u> , 205-222.	270	85
CHILDS R.A., DALCHAU R., SCUDDER P., HOUNSELL E.F., FABRE J.W., FEIZI T. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>110</u> , 423-431.	116	43
CHRISTENSEN B., KIELER J., VILLEN M., DON P., WANG C.Y., WOLF H. (1984) Anticancer Res., <u>4</u> , 319-338.	286	94
CODINGTON J.F. (1981) In : " Handbook of cancer Immunology", H. WATERS ed., Garland STPM Press, Vol. 8, p. 171-203.	54	24-49
CODINGTON J.F., SANFORD B.H., JEANLOZ R.W. (1972) Biochemistry, <u>11</u> , 2559-2564.	55	24-81
COLLARD J.G., VAN BEEK W.P., JANSSEN J.W.G., SCHIJJVEN J.F. (1985) Int. J. Cancer, <u>35</u> , 207-214.	235	72

	N°référence	Pages
COMAN D.R. (1944) Cancer Res., <u>4</u> , 625-629.	266	85
CUATRECASAS P. (1974) Ann. Rev. Biochem., <u>43</u> , 169-214.	209	60
CUATRECASAS P., ILLIANO G. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 4938-4946.	208	60
CUMMINGS R.D., KORNFELD S. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 11230-11234.	258	81-220
D		
DAHR W., UHLENBRUCK G., GUNSON H.H., VAN DER HART M. (1975) Vox Sang., <u>28</u> , 249-252.	46	22-23
DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D. (1986) In : "Molecular cell biology", Scientific American Books, Inc, New-York.	274	87
DEBRAY H. (1979) Bull. Cancer. (Paris), <u>66</u> , 353-372.	186	57
DEBRUYNE V., MONTREUIL J., SPIK G. (1983) In : "Protides of the biological fluids", Proceedings of the 35 th colloquium, H. PEETERS ed., Pergamon Press, p. 63-68.	243	75
DELANNOY P., DEBRAY H., MONTREUIL J. (1986) In : "Colloque international sur la biosynthèse des glycoprotéines", 16-22 Mars 1986, Aussois, France.	310	280
DE PETRIS S. (1977) In : "Cell surface reviews", POSTE G. and NICOLSON G.L., eds. Elsevier-Excerpta, North Holland, Amsterdam, <u>3</u> , p. 645-670.	15	10

	N°référence	Pages
DE SANTIS R., SANTER U.V., GLICK M.C. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>142</u> , 348-353.	236	72
DOUY A., GALLOT B. (1980) Biopolymers, <u>19</u> , 493-507.	95	36
DONALD A.S.R., SOH C.P.C., WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 58-65.	81	30
DORLAND L., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>122</u> , 859-866.	79	30-31
DULBECCO R. (1970) Nature, <u>227</u> , 802-806.	196	58
DUS D., BUDZYNSKI W., RADZIKOWSKI C. (1985) Arch. Immunol. Ther. Exp., <u>33</u> , 817-823.	287	94
E		
EDELMAN G.M. (1984) Ann. Rev. Neurosci, <u>7</u> , 339-377.	192	58
EDGE A.S.B. VAN LANGENHOVE A., REINHOLD V. WEBER P. (1986) Biochemistry, <u>25</u> , 8017-8024.	49	23
EMMELOT P. (1973) Eur. J. Cancer, <u>9</u> , 319-333.	3	7
EMMELOT P., BOS C.J., BENEDETTI E.L., RUMKE P.H. (1964) Biochim. Biophys. Acta, <u>90</u> , 126-145.	280	92

F	N°référence	Pages
FEENEY R.E., YEH Y. (1978) Adv. Prot. Chem., <u>32</u> , 191-282.	135	48
FEIZI T. (1981) Immunological Communications, <u>10</u> , 127-156.	112	41
FEIZI T. (1985) Cancer Surveys, <u>4</u> , 245-269.	106	41-44-80
FEIZI T., CHILDS R.A. (1985) Trends in Biochem. Sci., <u>10</u> , 24-29.	117	43
FERGUSON M.A.J., LOW M.G., CROSS G.A.M. (1985) J. Biol. Chem., <u>260</u> , 14547-14555.	23	13
FIALA S., FIALA A.E., DIXON B. (1972) J. Natl. Cancer Inst., <u>48</u> , 1393-1401.	306	272
FINNE J. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 11966-11970.	191	57
FINNE J., KRUSIUS T., MARGOLIS R.K., MARGOLIS R.U. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 10295-10300.	57	24-25
FRANCOIS-GERARD C., BROCTEUR J., ANDRE A., GERDAY C., PIERCE-CRETEL A., MONTREUIL J., SPIK G. (1980) Blood Transf. Immunohaematol, <u>13</u> , 579-587.	80	30-31
FRAZIER W.A., ROSEN S.D., REITHERMAN R.W., BARONDES S.H. (1975) J. Biol. Chem., <u>250</u> , 7714-7721.	159	53
FRYE L.D., EDIDIN M. (1970) J. Cell Sci., <u>7</u> , 319-335.	40	20

	N°référence	Pages
FUHRMANN U., BAUSE E., PLOEGH H. (1985) Biochim. Biophys. Acta, <u>825</u> , 95-110.	128	46
FUKUDA M., CARLSSON S.R., KLOCK J.C., DELL A. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 12796-12806.	52	23
FUKUDA M., DELL A., FUKUDA M.N. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 4782-4791.	87	32
FUKUDA M., FUKUDA M.N. (1981) J. Supramol. Struct. Cell Biochem., <u>17</u> , 313-324.	114	41
FUKUDA M., FUKUDA M.N., HAKOMORI S. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 3700-3703.	115	43
FUKUDA M., SPOONER E., OATES J.E., DELL A., KLOCK J.C. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 10925-10935.	90	32-79
FURTHMAYR H. (1977) J. Supramol. Struct., <u>7</u> , 121-134.	91	33
G		
GABIUS H.J., ENGELHARDT R., CRAMER F., BATGE R., NAGEL G.A. (1985) Cancer Res., <u>45</u> , 253-257.	178	55
GAHMBERG C.G., HAKOMORI S. (1973) J. Biol. Chem., <u>248</u> , 4311-4317.	28	16
GAIL M.H., BOONE C.W. (1972) Exp. Cell Res., <u>70</u> , 33-40.	267	85

	N°référence	Pages
GALLAGHER J.T., MORRIS A., DEXTER T.M. (1985) Biochem. J., <u>231</u> , 115-122.	295	220
GESNER B.M., GINSBURG V. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>52</u> , 750-755.	141	50
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 456-462.	137	49
GOLDSTEIN I.J., HUGHES R.C., MONSIGNY M., OSAWA T., SHARON N. (1980) Nature, <u>285</u> , 66.	292	113
GRABEL L.B., ROSEN S.D., MARTIN G.R. (1979) Cell, <u>17</u> , 477-484.	171	54
GRUMET M., HOFFMAN S., EDELMAN G.M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>81</u> , 267-271.	190	57
GUIDOTTI G. (1972) Ann. Rev. Biochem., <u>41</u> , 731-752.	9	8
H		
HAKIMI J., ATKINSON P.H. (1980) Biochemistry, <u>19</u> , 5619-5624.	200	58
HAKIMI J., CARVER J., ATKINSON P.H. (1981) Biochemistry, 20, 7314-7319.	73	29
HAKOMORI S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>67</u> , 1741-1747.	203	59
HAKOMORI S.I. (1975) Biochim. Biophys. Acta, <u>417</u> , 55-89.	214	63

	N°référence	Pages
HAKOMORI S. (1981) Ann. Rev. Biochem., <u>50</u> , 733-764.	33	18-44
HAKOMORI S. (1981) Seminars in Hematology, <u>18</u> , 39-62.	113	41
HAKOMORI S.I. (1984) Ann. Rev. Immunol., <u>2</u> , 103-126.	205	60-63 66-67
HAKOMORI S.I. (1985) Cancer Res., <u>45</u> , 2405-2414.	118	43-62-63 65-66
HAKOMORI S., KANNAGI R. (1983) J. Natl. Cancer Inst., <u>71</u> , 231-251.	30	18-44 63-64
HAKOMORI S., NUDELMAN E., LEVERY S.B., KANNAGI R. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 4672-4680.	253	79
HAKOMORI S.I., NUDELMAN E., LEVERY S., SOLTER D., KNOWLES B.A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>100</u> , 1578-1586.	247	79
HANNISH F.G., EGGE H., KATALINIC J.P., UHLENBRUCK G. (1986) FEBS Lett., <u>200</u> , 42-46.	252	79
HATANAKA M. (1974) Biochim. Biophys. Acta, <u>355</u> , 77-104.	273	87
HERBEMAN R.B. (1977) Biochim. Biophys. Acta, <u>473</u> , 93-119.	275	88
HOLT G.D., SNOW C.M., SENIOR A., HALTIWANGER R.S., GERACE L., HART G.W. (1987) J. Cell Biol., <u>104</u> , 1157-1164.	64	26
HOUNSELL E.F., FUKUDA M., POWELL M.E., FEIZI T., HAKOMORI S. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>92</u> , 1143-1150.	120	45

	N°référence	Pages
HOUNSELL E.F., GOOI H.C., FEIZI T. (1981) FEBS Lett., <u>131</u> , 279-282.	75	30
HUBBARD A.L., WILSON G., ASHWELL G., STUKENBROK (1979) J. Cell. Biol., <u>83</u> , 47-64.	164	54
HUBBARD S.C., IVATT R.J. (1981) Ann. Rev. Biochem., <u>50</u> , 555-583.	69	28
HUDGIN R.L., PRICER W.E., ASHWELL G. (1984) J. Biol. Chem., <u>249</u> , 5536-5543.	161	54
HUGHES R.C. (1975) In : "Essays biochem.", CAMPBELL P.N and ALBRIDGE W.N. eds, Academic Press, London, Vol 11, p. 1-36.	4	7-17
HUGHES R.C., FEENEY J. (1986) Eur. J. Biochem., <u>158</u> , 227-237.	72	29-35
HULL S.R., LAINE R.A., KAIZU T., RODRIGUEZ I., CARRAWAY K.L. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 4866-4877.	261	81
I		
INBAR M., SACHS L. (1969) Nature, <u>223</u> , 710-712.	8	7
IVATT R.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 4021-4025.	277	89
IVATT R.J., REEDER J.W., CLARK G.F. (1986) Biochim. Biophys. Acta, <u>883</u> , 253-264.	296	220

J	N° référence	Pages
JAMIESON G.A., URBAN C.L., BARBER A.J. (1971) Nature, <u>234</u> , 5-7.	147	51
JONES G.E., ARUMUGHAM R.G., TANZER M.L. (1986) J. Cell Biol., <u>103</u> , 1663-1670.	183	56
K		
KABAT E.A. (1978) J. Supramol. Struct., <u>8</u> , 79-88.	53	23
KALCKAR H.M. (1965) Science, <u>150</u> , 305-313.	1	7
KANNAGI R., LEVINE P., WATANABE K., HAKOMORI S. (1982) Cancer Res., <u>42</u> , 5249-5254.	220	66
KEENAN T.M., MORRE D.J. (1973) Science, <u>182</u> , 935-937.	216	63
KIEDA C., BOWLES D.J., RAVID A., SHARON N. (1978) FEBS Lett., <u>94</u> , 391-396.	169	54
KIEDA C., ROCHE A.C., DELMOTTE F., MONSIGNY M. (1979) FEBS Lett., <u>99</u> , 329-332.	170	54
KIELER J. (1984) Cancer Metast. Rev., <u>3</u> , 265-296.	285	94-288
KLEINMAN H.K., Mc GARVEY M.L., HASSEL J.R., MARTIN G.R. VAN EVERCOOREN A.B., DUBOIS-DALCQ M. (1984) In : "The role of extracellular matrix in development", ALAN R. LISS inc, New-York, p.123-143.	37	18

	N°référence	Pages
KOBATA A. (1984) In : "Biology of carbohydrates", V. GINSBURG and P.W. ROBBINS, eds, John WILEY and SONS, New-York, Vol. 2, p. 87-161.	44	20
KORNFELD R., KORNFELD S. (1980) In : "The Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans", W.J. LENNARZ, ed, Plenum, New-York, p. 1-34.	42	20
KORNFELD R., KORNFELD S. (1985) Ann. Rev. Biochem., <u>54</u> , 631-664.	45	20-28
KOSCIELAK J. (1986) Glycoconjugate J., <u>3</u> , 95-108.	107	41-42
KREUTTER D., KIM J.Y.H., GOLDENRING J.R., RASMUSSEN H. UKOMADU C., DELORENZO R.J., YU R.K. (1987) J. Biol. Chem., <u>262</u> , 1633-1637.	207	60
KRUSIUS T., FINNE J., MARGOLIS R.K., MARGOLIS R.U. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 8237-8242.	58	24-25
KRUSIUS T., FINNE J., RAUVALA H. (1978) Eur. J. Biochem., <u>92</u> , 289-300.	83	31
L		
LANGE-MUTSCHLER J. (1986) FEBS Lett., <u>201</u> , 210-214.	22	13
LARRIBA G. (1978) FEBS Lett., <u>95</u> , 190-193.	61	24

	N°référence	Pages
LEE Y.C., SCOCCA J.R. (1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 5753-5758.	302	222
LEVI G., TEICHBERG V.I. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 5135-5140.	179	55
LI E., KORNFELD S. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 1600-1605.	74	29
LI Z.Q., PERKINS S.J., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1983) Eur. J. Biochem., <u>130</u> , 275-279.	96	36
LIANG C.J., YAMASHITA K., MUELLENBERG C.G., SHICHI H. KOBATA A. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 6414-6418.	93	35
LIS H., SHARON N. (1977) In : "The antigens", M. SELA ed, Vol. 4, Academic Press, New-York, p. 429-459.	211	60
LIS H., SHARON N. (1984) In : "Biology of carbohydrates", GINSBURG V. and ROBBINS P.W. eds, John WILEY and SONS, New-York, Vol. II, p. 1-85.	131	47
LIS H., SHARON N. (1986) Ann. Rev. Biochem., <u>55</u> , 35-67.	153	51
LISOWSKA E. (1981) Blood Transf. Immunohaemat., <u>24</u> , 75-85.	111	41
LISOWSKA E., DUK M., DAHR W. (1980) Carbohydr. Res., <u>79</u> , 103-113.	110	41
LLOYD C.W. (1975) Biol. Rev., <u>50</u> , 325-350.	10	8

	N° référence	Pages
LOH Y.P., GAINER H. (1978) FEBS Lett., <u>96</u> , 269-272.	140	50
LOW M.G., FERGUSON M.A.J., FUTERMAN A.H., SILMAN I. (1986) Trends Biochem. Sci., <u>11</u> , 212-213.	19	13-15
LOW M.G., FINEAN J.B. (1977) Biochem. J., <u>167</u> , 281-284.	21	13
LOW M.G., KINCADE P.W. (1985) Nature, <u>318</u> , 62-64.	20	13
LOWE M., NILSSON B. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 1885-1887.	88	32
LUNNEY J., ASHWELL G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>73</u> , 341-343.	162	54
M		
MACHER B.A., LEE W.M.F., WESTRICK M.A. (1982) Mol. Cell Biochem., <u>47</u> , 81-95.	215	63
MACPHERSON I., STOCKER M. (1962) Virology, <u>16</u> , 147-151.	282	93
MAGNANI J.L., BALL E.D., FANGER M.W., HAKOMORI S.I., GINSBURG V. (1984) Arch. Biochem. Biophys., <u>223</u> , 501-504.	250	79
MAGNANI J.L., NILSSON B., BROCKHAUS M., ZOPF D., STEPLEWSKI H., GINSBURG V. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 14365-14369.	254	79
MAGNANI J., STEPLEWSKI Z., KOPROWSKI H., GINSBURG V. - (1983) Cancer Res., <u>43</u> , 5489-5492.	255	79

	N°référence	Pages
MAJERUS P.W., CONNOLLY T.M., DECKMYN H., ROSS T.S., BROSS T.E., ISHII H., BANSAI V.S., WILSON D.B. (1986) Science, 234, 1519-1526.	27	16
MAJERUS P.W., WILSON D.B., CONNOLLY T.M., BROSS T.E., NEUFELD E.J. (1986) Trends Biochem. Sci., <u>8</u> , 167-169.	26	16
MAKELA O., CANTELL K. (1958) Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., <u>36</u> , 366-374.	123	46
MARCHESI V.T., FURTHMAYR H., TOMITA M. (1976) Ann. Rev. Biochem., <u>45</u> , 667-698.	92	34
MARTINEZ-PALOMO A. (1970) Int. Rev. Cytol., <u>29</u> , 29-81.	34	18
MAYO J.G. (1972) Can. Chemother. Rep., <u>3</u> , 325-330.	288	94
Mc LAWHON R.W., SCHUON G.S., DAWSON G. (1981) Eur. J. Cell Biol., <u>25</u> , 353-358.	276	89
MEEZAN E., WU H.C., BLACK P.H., ROBBINS P.W. (1969) Biochemistry, <u>8</u> , 2518-2524.	227	68-69
MESCHER M.F. (1981) Trends Biochem. Sci., <u>6</u> , 97-99.	133	47-48
MICHALSKI J.C., PETER-KATALANIC J., EGGE H., PAZ-PARENTE J., MONTREUIL J., STRECKER G. (1984) Carbohydr. Res., <u>134</u> , 177-189.	301	222
MIZUOCHI T., NISCHIMURA R., DERAPPE C., TANIGUCHI T., HAMAMOTO H., MOCHIZUKI M., KOBATA A. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 14216-14219.	245	76-78

	N°référence	Pages
MONSIGNY M., KIEDA C., ROCHE A.C. (1979) Biol. Cell, <u>36</u> , 289-300.	150	51
MONSIGNY M., KIEDA C., ROCHE A.C. (1983) Biol. Cell, <u>47</u> , 95-110.	152	51
MONSIGNY M., ROCHE A.C., MIDOUX P. (1984) Biol. Cell, <u>51</u> , 187-196.	177	55
MONSIGNY M., ROCHE A.C., SENE C., MAGET-DANA R., DELMOTTE F. (1980) Eur. J. Biochem., <u>104</u> , 147-153.	291	95-131
MONTAGNIER L., GRUEST J., BOCCARA M. (1971) In : "La L-asparagine", colloques internationaux CNRS (ed), n°197, p. 159-164.	283	93
MONTAGNIER L., MAC PHERSON I. (1964) C.R. Acad. Sci. (Paris), <u>258</u> , 4171-4173.	269	85
MONTREUIL J. (1975) Pure Appl. Chem., <u>42</u> , 431-477.	67	26-27-28 36-37
MONTREUIL J. (1980) In : "Proc. SHARON KATSIR-KATCHALSKY Conference on Carbohydrate-Protein Interactions", Kibbutz Kiryat Anavim, <u>9</u> , 3-4.	97	36-37-39
MONTREUIL J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., <u>37</u> , 157-223.	103	40
MONTREUIL J. (1982) In : "Comprehensive biochemistry", A. NEUBERGER and L.L.M. VAN DEENEN, eds, Elsevier, Amsterdam, <u>19B</u> , Part II, p. 1-188.	43	20-21-28 30-46-48
MONTREUIL J. (1984) Biol. Cell, <u>51</u> , 115-131.	100	36-37 40-44

	N°référence	Pages
MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G. (1978) C.R. Acad. Sci. (Paris), <u>287D</u> , 837-840.	94	36-37
MORELL A.G., IRVINE R.A., STERNLIEB I., STEINBERG I.H. ASHWELL G. (1968) J. Biol. Chem., <u>243</u> , 155-159.	142	50
MULLER W.E.G., MULLER I. (1980) Mol. Cell Biochem., <u>29</u> , 131.	172	55
MURAMATSU H., ISHIHARA H., MIYAUCHI T., GACHELIN G., FUJISAKI T., TESIMA S., MURAMATSU T. (1983) J. Biochem., <u>94</u> , 799-810.	257	81
MURAMATSU T., ATKINSON P.M., NATHENSON S.G., CECCARINI C. (1973) J. Mol. Biol., <u>80</u> , 781-799.	294	219
MURAMATSU T., KOIDE N., CECCARINI C., ATKINSON P.H. (1976) J. Biol. Chem., <u>251</u> , 4673-4679.	199	58-75
MURAYAMA K., NICHOLS E.J., LEVERY S.B., CARTER W.G., HAKOMORI S.I. (1984) Glycoconjugate J., <u>1</u> , 155-169.	309	280
N		
NEVILLE D.M. (1960) J. Biophys. Biochem. Cytol, <u>8</u> , 413-422.	278	90
NICOLSON G.L. (1979) Curr. Topics Dev. Biol., <u>13</u> , 305-338.	12	9
NICOLSON G.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta, <u>695</u> , 113-176.	224	66

	N°référence	Pages
NICOLSON G.L., WINKELHAKE J.L. (1975) Nature, <u>255</u> , 230-232.	268	85
NOVOGRODSKY A. (1975) J. Immunol., <u>114</u> , 1089-1093.	212	61
NOWAK T.P., KOBILER D., ROEL L.E., BARONDES S.H. (1977) J. Biol. Chem., <u>252</u> , 6026-6030.	168	54
NOWELL P.C. (1960) Cancer Res., <u>20</u> , 462-466.	5	7
0		
OCKLIND C., OBRINK B. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 6788-6795.	189	57
OFEK I., MIRELMAN D., SHARON N. (1977) Nature, <u>265</u> , 623-625.	156	53
OGATA S.I., MURAMATSU T., KOBATA A. (1976) Nature, <u>259</u> , 580-582.	238	73
OLDEN K., PARENT J.B., WHITE S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta, <u>650</u> , 209-232.	138	49-50
OLIVER G., HEMMING F. (1975) Biochem. J., <u>152</u> , 191-199.	293	219
OLSNES S., PIHL A. (1982) In : "The molecular actions of toxins and viruses", P. COHEN and S. VAN HEYNINGEN eds, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 51-105.	210	60

P	N°référence	Pages
PARDEE A.B. (1975) Biochim. Biophys. Acta, <u>417</u> , 153-171.	272	87
PAULSON J. (1985) In : "The receptors", Vol. II, CONN P.M., ed, Academic Press, New-York, p.131.	157	53
PAZ-PARENTE J., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. (1982) J. Chromatogr., <u>249</u> , 199-204.	304	224
PEARLSTEIN E., GOLD L.I., GARCIA-PARDO A. (1980) Mol. Cell Biochem., <u>29</u> , 103-128.	305	272
PIERCE M., ARANGO J. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 10772-10777.	242	75
PIERCE M., TURLEY E.A., ROTH S. (1980) Int. Rev. Cytol., <u>65</u> , 1-47.	146	51
PLUMMER T.H., ELDER J.H., ALEXANDER S., PHELAN A.W., TARENTINO A.L. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 10700-10704.	125	46
PRIEELS J.P., PIZZO S.V., GLASGOW L.R., PAULSON J.C., HILL R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>75</u> , 2215-2219.	166	54
R		
RAUVALA H., FINNE J. (1979) FEBS Lett., <u>97</u> , 1-8.	76	30-41-44

	N°référence	Pages
RAUVALA H., HAKOMORI S. (1981) J. Cell Biol., <u>88</u> , 149-159.	202	59
RAY T.K. (1970) Biochim. Biophys. Acta, <u>196</u> , 1-9.	279	90-92
RAZ A., LOTAN R. (1981) Cancer Res., <u>41</u> , 3642-3647.	175	55
READING C.L., HUTCHINS J.T. (1985) Cancer Mestast. Rev., <u>4</u> , 221-260.	213	63-66
ROBBINS J.C., NICOLSON G.L. (1975) In : "Biology of tumours : surface, immunology and comparative pathology", Vol. 4, New-York, Plenum Publishing Corp., p. 3-54.	263	82-83
RODEN L. (1980) In : "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans", W.J. LENNAZ ed. Plenum, New-York, p. 267-371.	56	24
ROSEMAN S. (1970) Chem. Phys. Lipids, <u>5</u> , 270-297.	143	51
ROTH S., Mc GUIRE E.J., ROSEMAN S. (1971) J. Cell Biol., <u>51</u> , 536-547.	148	51
ROTHMAN J.E., LENARD J. (1977) Science, <u>195</u> , 743-753.	17	13-14
RUOSLAHTI E., HAYMAN E.G., PIERSCHBACHER M.D. (1985) Arteriosclerosis, <u>5</u> , 581-594.	182	56
RUTISHAUSER U. (1984) Nature, <u>310</u> , 549-554.	193	58

S	N°référence	Pages
SAHAGIAN G.G., DISTLER J., JOURDIAN G.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 4289-4293.	167	54
SAKIYAMA H., GROSS S.K., ROBBINS P.W. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>69</u> , 872-876.	204	59
SANFORD B.H., CODINGTON J.F., JEANLOZ R.W., PALMER P.D. (1973) J. Immunol, <u>110</u> , 1233-1237.	262	82
SANGER R. (1975) In : "Transfusion and Immunology, plenary lectures 14 th congress soc blood transf and 10 th Congr world federation hemophilia, Finnish red cross blood transf service", p.2	108	41
SANTER U.V., GILBERT F., GLICK M.C. (1984) Cancer Res., <u>44</u> , 3730-3735.	234	72
SANTER U.V., GLICK M.C., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G. (1983) Carbohydr. Res., <u>120</u> , 197-217.	248	79
SCHACHTER H. (1984) Clinical Biochem., <u>17</u> , 3-14.	105	40-89
SCHREVEL J., GROS D., MONSIGNY M. (1981) Progr. Histochem. Cytochem., <u>14</u> , n°2, 1-269.	14	10
SCHWARZ R.T., DATEMA R. (1982) In : "The glycoconjugates", M.I. HOROWITZ ed, Vol. III, Academic Press, New-York, p. 47-75.	127	46
SEARS H.F., HERLYN M., VILLANO B.D., STEPLEWSKI Z., KOPROWSKI H. (1982) J. Clin. Immunol, <u>2</u> , 141-149.	256	79

	N°référence	Pages
SHAROM F.J., GRANT C.W.M. (1977) J. Supramol. Struct., <u>6</u> , 249.	32	18
SHARON N., LIS H. (1982) In : "The Proteins", Vol. V, 3 rd edn, H. NEURATH and R.L. HILL, eds, Academic Press, New-York, p. 1-144.	121	46
SHUR B.D. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 6871-6878.	149	51
SHUR B.D., ROTH S. (1975) Biochim. Biophys. Acta, <u>415</u> , 473-512.	144	51
SIDDIQUI B., WHITEHEAD J.S., KYM Y.S. (1978) J. Biol. Chem., <u>253</u> , 2168-2175.	217	63
SINGER S.J., NICOLSON G.L. (1972) Science, <u>175</u> , 720-721.	11	8
SMETS L.A., VAN BEEK W.P. (1983) In : "Structural carbohydrates in the liver", H. POPPER, W. REUTTER, F. GUDAT and E. KOTTGEN, eds, MTP Press limited, Boston, Falk Symposium 34, p. 325-332.	187	57
SMETS L.A., VAN BEEK W.P. (1984) Biochim. Biophys. Acta, <u>738</u> , 237-249.	226	66
SOLTER D., KNOWLES B.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>75</u> , 5565-5569.	246	79
SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem., <u>121</u> , 413-419.	85	31-79

	N°référence	Pages
SPIRO R.G. (1970) In : "Chemistry and molecular biology of the intracellular matrix", E.A. BALASZ ed, Academic Press, New-York, p. 195-215.	66	26
SPIRO R.G., BHOYROO V.D. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 5347-5354	60	24
SPRINGER G.F. (1984) Science, <u>224</u> , 1198-1206,	109	41-81
SPRINGER G.F., CHEINGSONG-POPOV R., SCHIRRMACHER V., DESAI P.R., TEGTMEYER H. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 5702-5706.	176	55
STAHL P.D., RODMAN J.S., MILLER M.J., SCHLESINGER P.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>75</u> , 1399-1403.	165	54
STANLEY P. (1984) Ann. Rev. Genet., <u>18</u> , 525-552.	129	47-94
STECK G.L., DAWSON G. (1974) J. Biol. Chem., <u>249</u> 2135-2142.	29	16
STEINER S.M., VIA D., LARRIBAG., SRAMEK S., LAINE R.A. (1978) In : "Glycoproteins and glycolipids in disease processes", E.F. WALBORG ed, Am. Chem. Soc. Symp. n°80, p. 378-403, Washington.	62	26
STOKER M.G.P., RUBIN H. (1967) Nature, <u>215</u> , 171-172.	197	58
STOOLMAN L.H., TENFORDE T.S., ROSEN S.D. (1984) J. Cell Biol., <u>99</u> , 1535-1540.	174	55

	N°référence	Pages
STRECKER G., MONTREUIL J. (1979) Biochimie, <u>61</u> , 1199-1246.	41	20
STRECKER G., PIERCE-CRETEL A., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J. (1981) Anal. Biochem., <u>111</u> , 17-26.	77	30
STROMINGER J.L., CRESSWELL P., GREY H., HUMPHREYS R.E., MANN D., McCUNE J., PARHAM P., ROBB R., SANDERSON A.R., SPRINGER T.A., TERHOST C., TURNER M.J., (1974) Transplant. Rev., <u>21</u> , 126.	119	43
T		
TAKAHASI N. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>76</u> , 1194-1201.	124	46
TAKASAKI S., IKEHARA H., KOBATA A. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>92</u> , 735-742.	240	73
TAKASAKI S., YAMASHITA K., KOBATA A. (1978) J. Biol. Chem., <u>253</u> , 6086-6091.	47	23
TAMURA G. (1982) In : "Tunicamycin", TAMURA G. ed, Japon Scientific Society Press, Tokyo.	126	46
TANNER M.J.A. (1978) In : "Current Topics in membranes and transport", JULIANO R.L. and ROTHSTEIN A. eds, Vol. II, Academic Press, New-York-London, p. 279-325.	134	48
TEICHBERG V.I., SILMAN I., BEITSCH D.D., RESHEFF G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>72</u> , 1383-1387.	160	54

	N°référence	Pages
THOMAS D.B., WINZLER R.J. (1969) J. Biol. Chem., <u>244</u> , 5943-5946.	48	23
THOMPSON T.E., TILLACK T.W. (1985) Ann. Rev. Biophys. Chem., <u>14</u> , 361-386.	31	18
TOLVANEN M., GAHMBERG C.G. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 9546-9551.	132	47
TORPIER G., MONTAGNIER L. (1973) Int. J. Cancer, <u>11</u> , 604-615.	16	12-84-86
TORRES C.R., HART G.W. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 3308-3317.	63	26
TSUJI T., TSUNEHISA S., WATANABE Y., YAMAMOTO K., TOHYAMA H., OSAWA T. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 6335-6339.	50	23
U		
URDAL D.L., HAKOMORI S. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 6869-6874.	221	66
V		
VACQUIER V.D., MOY G.W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>74</u> , 2456-2460.	173	55
VAN BEEK W.P., SMETS L.A., EMMELOT P. (1973) Cancer Res., <u>33</u> , 2913-2922.	233	72
VAN DEN EIJNDEN D.H., EVANS N.A., CODINGTON J.F., REINHOLD V., SILBER C., JEANLOZ R.W., (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 12153-12159.	51	23

	N°référence	Pages
VAN DEN HEEDE J.R., AHMED A.I., FEENEY R.E. (1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 7885-7889.	136	48
VERBERT A., CACAN R., MONTREUIL J. (1976) Eur. J. Biochem., <u>70</u> , 49-53.	145	51
VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H. (1983) Adv. Carb. Chem. Biochem., <u>41</u> , 209-374.	101	36-38 225
VLIEGENTHART J.F.G., VAN HALBEEK H., DORLAND L. (1981) Pure. Appl. Chem., <u>53</u> , 45-77.	104	40-225
VON FIGURA K., HASILIK A. (1986) Ann. Rev. Biochem., <u>55</u> , 167-193.	154	51
W		
WAGNER D.D., IVATT R., DESTREE A.T., HYNES R.O. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 11708-11715.	308	280
WARBURG O. (1923) Biochem. Z., <u>142</u> , 317.	271	87
WARREN L., BUCK C.A., TUCZINSKI G.P. (1978) Biochim. Biophys. Acta, <u>516</u> , 97-127.	222	66
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A. (1973) Fed. Proc., <u>32</u> , 80-55.	229	72
WIDNELL C.C., UNKELESS J.C. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>61</u> , 1050-1057.	307	272
WISEMAN G., BRAMWELL M.E., BHAVANANDAN V.P., HARRIS H. (1984) Biochem. Soc. Trans., <u>12</u> , 537-538.	259	81

	N°référence	Pages
WOOD E., FEIZI T. (1979) FEBS Lett., <u>104</u> , 135-140.	82	31
Y		
YAMADA K.M., AKIYAMA S.K., HASEGAWA T., HASEGAWA E., HUMPHRIES M.J., KENNEDY D.W., NAGATA K., URUSHIHARA H., OLDEN K., CHEN W.T. (1985) J. Cell Biochem., <u>28</u> , 79-97.	35	18
YAMADA K.M., HAYASHI M., HIRANO H., AKIYAMA S.K. (1984) In : "The role of extracellular matrix in development", ALAN R. LISS inc, New-York, p. 89-121.	36	18
YAMADA K.M., YAMADA S., PASTAN I. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>73</u> , 1217-1221.	265	85
YAMAGUCHI Y., ISEMURA M., YOSIZAWA Z., KAN M., SATO A. (1986) Int. J. Biochem., <u>18</u> , 437-443.	184	56
YAMASHITA K., HITOI A., TANIGUCHI N., YOKOSAWA N., TSUKUDA Y., KOBATA A. (1983) Cancer Res., <u>43</u> , 5059-5063.	244	76-77 272
YAMASHITA K., OHKURA T., TACHIBANA Y., TAKASAKI S., KOBATA A. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 10834-10840.	89	32-73-74
YAMASHITA K., TACHIBANA Y., OHKURA T., KOBATA A. (1985) J. Biol. Chem., <u>260</u> , 3963-3969.	241	75-280
YAMASHITA K., TOTANI K., OHKURA T., TAKASAKI S., GOLDSTEIN I.J., KOBATA A. (1987) J. Biol. Chem., <u>262</u> , 1602-1607.	297	220

031 929 01X

	N°référence	Pages
YOGEESWARAN G. (1983) Adv. Cancer. Res., <u>38</u> , 289-350.	225	66
YOGEESWARAN G., SALK P. (1981) Science, <u>212</u> , 1514-1516.	289	95
YOKOTA M., WARNER G., HAKOMORI S. (1981) Cancer Res., <u>41</u> , 4185-4190.	218	66
YOSHIMA H., FURTHMAYR H., KOBATA A. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 9713-9718.	84	31-32
YOSIZAWA Z., SATO T., SCHMID K. (1966) Biochim. Biophys. Acta, <u>121</u> , 417-420.	299	222
YOUNG W.W., HAKOMORI S., LEVINE P. (1979) J. Immunol, <u>123</u> , 92-96.	219	66
Z		
ZAVADA J., MAC PHERSON I. (1970) Nature, <u>225</u> , 24-26.	284	93
ZHU B.C.R., FISHER S.F., PANDE H., CALAYCAY J., SHIVELY J.E., LAINE R.A. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 3962-3970.	139	50-56

