

N° d'ordre : 371

50376
1989
337

50376
1989
337

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

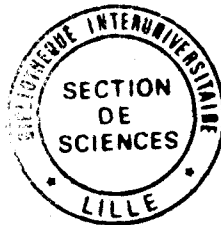
par

ZHU QIN

ETUDE DES MODIFICATION DE LA SIALYLATION

DES CELLULES MALIGNES

ET METASTATIQUES



Présentée le 23.06.1989 devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL
Rapporteurs : B. FOURNET
A. VERBERT
M. LHERMITTE
Examineurs : R. CACAN
P. ROUSSEL

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL au sein du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité mixte de Recherche du C.N.R.S. n° 111 : Relation Structure-Fonction des Constituants Membranaires).

INTRODUCTION

1

GENERALITES**I. LES ACIDES SIALIQUES.**

2

A - Structure des acides sialiques.

2

B - Acides sialiques des glycannes des glycoconjugués.

1. Les O-glycosylprotéines.

2

Les acides sialiques des O-glycosylprotéines.

4

2. Les N-glycosylprotéines.

4

Les acides sialiques des N-glycosylprotéines.

7

3. Les glycosphingolipides

7

Les acides sialiques des gangliosides.

11

C - Les acides sialiques des glycoconjugués membranaires.

11

II. METABOLISME DES ACIDES SIALIQUES.

15

A - Biosynthèse des acides sialiques.

15

B - Les processus de la sialylation.

15

1. Le précurseur.

15

2. Les sialyltransférases.

15

C - Catabolisme des acides sialiques.

19

1. Les sialidases.

19

2. La sialidose.

19

III. ROLE DES ACIDES SIALIQUES.

20

IV. ACIDES SIALIQUES ET TRANSFORMATION MALIGNNE.A - Modifications des glycolipides.

25

B - Modifications des glycannes des glycoprotéines membranaires.

25

	Page
1. Augmentation de l'antennarisation.	25
2. Augmentation de la proportion de glycanes possédant un résidu de N-acétyllglucosamine en position "intercalaire".	28
3. Augmentation de la sialylation.	28
4. Activité sialyltransférasique des cellules transformées.	29

V. CONCLUSIONS. 31

MATERIELS ET METHODES

I. MODELES EXPERIMENTAUX. 32

A - <u>Cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis (cellules LL2) à haut et à faible pouvoir métastatique.</u>	32
B - <u>Cellules uro-épithéliales humaines normales et cancéreuses.</u>	33
C - <u>Modèle BHK - BHK/HSv.</u>	33
D - <u>Modèle de fibroblastes Murins NIH-3T3.</u>	33

II. CELLULES ET CONDITIONS DE CULTURE. 34

A - <u>Condition de culture.</u>	34
B - <u>Clonage dans un milieu semi-solide.</u>	36
C - <u>Sélection des variants lectines-résistants.</u>	36
D - <u>Extraction des lipides des membranes cellulaires.</u>	37
E - <u>Libération de l'acide neuraminique des glycanes.</u>	37
1 - <u>L'hydrolyse acide.</u>	38
2 - <u>Méthanolyse.</u>	38
F - <u>Dosage de l'acide neuraminique libéré.</u>	38
1 - <u>Méthode de Warren.</u>	38
2 - <u>Utilisation de la technique d'HPLC.</u>	39
G - <u>Identification de l'acide N-acétylneuraminique et N-glycolylneuraminique par analyse en CPG après méthylation.</u>	39
H - <u>Identification et dosage des monosaccharides sous forme de méthylglycosides trifluoroacétylés.</u>	40

	Page
I - <u>Identification des glycoprotéines membranaires par des lectine radiomarquées.</u>	40
1 - Radio-iodation des lectines.	40
2 - Solubilisation des protéines membranaires.	41
3 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S.	41
4. Visualisation des glycoprotéines par incubation avec les lectines radio-marquées.	42

RESULTS

I. ETUDE DES MODIFICATIONS DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES MEMBRANAIRES LIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE DE CELLULES URO-EPITHELIALES HUMAINES.	43
A - <u>Introduction</u>	44
B - <u>Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uro-epithelial cell lines.</u>	46
C - <u>Conclusion</u>	51
II. MISE EN EVIDENCE DES MODIFICATIONS DE LA N-GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES DES CELLULES DU CARCINOME PULMONAIRE DE LEWIS, A HAUT ET A FAIBLE POUVOIR METASTATIQUE, PAR UTILISATION DE LECTINES RADIO-MARQUEES.	52
A - <u>Introduction</u>	53
B - <u>Résultats</u>	55
C - <u>Discussion et conclusion</u>	61
III. ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE L'AUGMENTATION DE LA QUANTITE DE D'ACIDES SIALIQUES ET LE POUVOIR METASTATIQUE DES CELLULES TUMORALES.	63
A - <u>Introduction</u>	64

	Page
B - <u>Dosage de l'acide sialique des membranes cellulaires</u>	64
C - <u>Détermination de la composition en monosaccharides des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis.</u>	69
D - <u>Discussion et conclusion.</u>	71
IV. ETUDE DES MODIFICATIONS DU RAPPORT Neu5Ac / Neu5Gc DANS LES CELLULES TRANSFORMEES PAR L'ONCOGENE c-Ha-ras.	73
A - <u>Introduction</u>	74
B - <u>Détermination des conditions optimales d'hydrolyse du Neu5Ac et du Neu5Gc sur la lactotransferrine bovine et le fibrinogène bovin.</u>	75
C - <u>Identification du Neu5Ac et du Neu5Gc des cellules BHK21/13-HSv.</u>	75
D - <u>Appearance of N-glycolylneuraminic acid in c-Ha-ras transfected mouse fibroblast cell lines is associated with transformation.</u>	82
E - <u>Discussion et conclusion</u>	92
 <u>CONCLUSION GENERALE</u>	 93
 BIBLIOGRAPHIE	 95

ABBREVIATIONS.

AAA	: <i>Aleuria aurantia</i>
AcCoA	: acétyl-coenzyme A
ADP	: adénosine diphosphate
AMP	: adénosine monophosphate
Asn	: asparagine
ATP	: adénosine triphosphate
BHK21/C13	: fibroblastes de rein de Hamster
Cer	: ceramide
CI-MS	: spectre de masse par ionisation chimique
CoA	: coenzyme A
ConA	: lectine de <i>Canavalia ensiformis</i>
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
cpm	: coups par minute
dpm	: désintégrations par minute
EI-MS	: spectre de masse par impact électronique
Fuc	: L-Fucose
Gal	: L-galactose
Glc	: D-glucose
GlcN	: D-glucosamine
GlcNAc	: N-acétyl-D-glucosamine
GlcNAc-1-P	: N-acétyl-D-glucosamin-1-phosphate
Glc-6-P	: D-glucose-6-phosphate
GlcN-6-P	: D-glucosamine-6-phosphate
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
HSv	: virus du sarcome du Hamster
kDa	: kilodalton
LCA	: lectine de <i>lens culinaris</i>
Man	: D-mannose
ManNAc	: N-acétyl-D-mannosamine
ManNAc-6-P	: N-acétylmannosamine-6-phosphate
m/e	: rapport masse / charge
NAD(P) ⁺ NAD(P)H	: nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
Neu5Ac	: acide N-acétylneuraminique
NeuAc5Gc	: acide N-glycolylneuraminique
PBS	: tampon phosphate 10 mM NaCl 0,154 M pH 7,2
PMSF	: phényl méthylsulfonyl fluorure
PPI	: pyrophosphate
RCAII	: <i>Ricinus communis</i>
SDS	: dodécylsulfate de sodium
Ser	: Serine
SNA	: <i>Sambucus nigra-L</i>
Thr	: Threonine
Tris	: (hydroxyméthyl)-aminométhane
UDP	: uridine diphosphate
UTP	: uridine triphosphate
WGA	: lectine de germe de blé

Les glycoconjugués de la surface cellulaire jouent un rôle essentiel dans les mécanismes qui régissent la "vie sociale" des cellules. A cet égard, les modifications de ces structures observées lors de la transformation maligne sont vraisemblablement en relation directe avec le comportement anarchique des cellules tumorales ainsi qu'avec la dissociation spontanée, l'essaimage et la fixation des cellules tumorales au niveau des tissus cibles lors de la métastase.

En effet, les glycanes des glycoconjugués cellulaires sont profondément altérés suite à la transformation cancéreuse. Entre autres, de nombreux travaux ont montré qu'il apparaissait généralement une augmentation sensible de la sialylation dans les cellules transformées chimiquement, viralement ou spontanément par rapport aux cellules normales. De plus certaines études ont mis en évidence le fait que la potentialité métastatique des cellules tumorales était influencée et régulée par le degré de sialylation des glycanes de la surface cellulaire.

C'est dans ce cadre que se place notre étude. La tumorigénicité et la capacité métastatique des cellules transformées du carcinome pulmonaire de Lewis et de leurs variants résistants à diverses lectines nous ont permis de mettre en évidence une relation directe entre le taux élevé d'acides sialiques à la surface cellulaire et le pouvoir métastatique de ces différents variants. Les cellules cancéreuses et invasives uro-épithéliales nous ont conduit à l'étude de la poly-antennarisation des glycanes de la surface cellulaire. Une partie des résultats obtenus ont fait l'objet d'un mémoire. Enfin, nous avons entrepris une analyse qualitative et quantitative des acides sialiques présents à la surface des cellules BHK 21/C13 transformées par le virus du sarcome du Hamster et des cellules BHK21/C13 et NIH-3T3 transformées *in vitro* par transfection de l'oncogène humain c-Ha-ras EJ.

Cette étude a conduit aux publications suivantes :

1. H. DEBRAY, Z. QIN, P. DELANNOY, J. MONTREUIL, D. DUS, C. RADZIKOVSKI, B. CHRISTENSEN AND J. KIELER.
Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uro-epithelial cell lines. Int. J. Cancer (1986) 37, 607-611.
2. Q. ZHU, V. LAUDET, H. CAZLARIS, N. LE MARER, P. DELANNOY AND J. MONTREUIL.
Appearance of N-glycolylneuraminic acid in c-Ha-ras-transfected mouse fibroblast cell lines is associated with transformation. Science (1989) soumis pour publication.

I. LES ACIDES SIALIQUES.

A - Structure des acides sialiques.

Avant de discuter des propriétés des acides sialiques, rappelons brièvement leur structure. Les acides sialiques dérivent de la substitution par divers groupements de l'acide neuraminique ou acide 5-amino-3,5-didésoxy-D-glycéro-D-galacto-nonulosonique.

L'acide neuraminique (Fig.1, p. 3) existe dans la conformation chaise 2C_5 avec la configuration β -anomérique (Haverkamp et al. 1982). L'acide sialique lié sur la chaîne d'oligosaccharides est en configuration anomérique α . Les diverses fonctions de l'acide neuraminique peuvent être substituées par les groupements suivants : acétyl-, glycolyl-, méthyl-, lactyl-, phosphate et sulfate (Fig.1, p. 3).

Il est possible de dénombrer actuellement 23 structures différentes selon la position des substituants. L'acide N-acétyl-neuraminique-9-phosphate est un intermédiaire de la biosynthèse et n'a pas été trouvé pour le moment dans les structures glycaniques (Schauer, 1985).

B - Acides sialiques des glycanes des glycoconjugués.

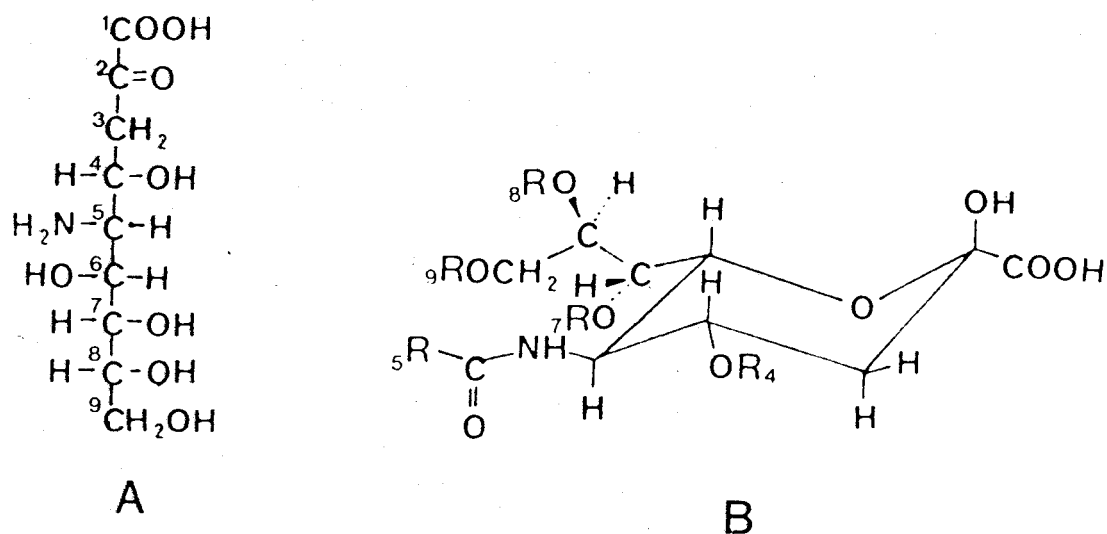
L'acide sialique est largement répandu dans la nature, soit libre, soit lié aux homo- et hétéro-saccharides, glycoprotéines et glycolipides (Tuppy et Gottschalk, 1972). Afin de mieux connaître la nature de l'acide sialique, nous rappelons tout d'abord la classification des glycanes des glycoprotéines.

On rencontre deux types de liaisons glycaniques dans les glycoprotéines : les liaisons de type O-glycosidique et de type N-glycosidique.

Ces deux types de liaison conduisent à classer les glycoprotéines en O-glycosylprotéines, N-glycosylprotéines et N,O-glycosylprotéines, cette dernière classe étant porteuse des glycanes des deux types (pour une classification complète, voir la revue de Montreuil, 1975)

1. Les O-glycosylprotéines.

Les O-glycosylprotéines résultent de la conjugaison d'une liaison O-glycosidique entre un hydroxy-amino-acide, d'une part, et l'un des



R_5		$R_{4 \cdot 7 \cdot 8 \cdot 9}$
$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$		-H
$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_2 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{-C-CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
		$\text{-O-CH-CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{O} \quad \text{OH}$
		-CH_3
		$\text{-SO}_3\text{H}$
		$\text{-PO}_3\text{H}_2$

Figure 1. Structure de l'acide neuraminique et de ces dérivés naturels.
(d'après la revue de Schauer, 1985).

A : Structure linéaire de l'acide neuraminique.

B : Structure des dérivés naturels, N- et O- substitués de l'acide neuraminique en conformation chaise 2C_5 .

monosaccharides suivants: N-acétylgalactosamine, xylose, galactose, mannose, arabinose.

Quatre "noyaux" peuvent être distingués dans les O-glycannes de mucines (Carlsson, 1963; Carlsson et al., 1978) :

Noyau 1 : Gal(β -1,3)GalNAc-Ser/Thr

Noyau 2 : Gal(β -1,3)[GalNAc(β -1,6)]GalNAc-Ser/Thr

Noyau 3 : GlcNAc(β -1,3)GalNAc-Ser/Thr

Noyau 4 : GlcNAc(β -1,3)[GlcNAc(β -1,6)]GalNAc-Ser/Thr

Ces structures communes sont substituées par des monosaccharides pour former les chaînes très complexes des O-glycannes. Quelques exemples de ce type de structure sont donnés dans le tableau I (p. 5).

Les acides sialiques des O-glycosylprotéines.

Dans les glycannes de mucines, les acides sialiques se trouvent en différentes positions sur la chaîne oligosaccharidique: soit en α -2,3 sur les résidus de N-acétylgalactosamine et/ou de galactose, ou encore en α -2,4 sur les résidus de Gal(β -1,3) en position terminale non-réductrice (Slomiany et Slomiany, 1978).

2. Les N-glycosylprotéines.

La seule liaison de type N-glycosidique présente dans les N-glycosylprotéines et les protéoglycannes implique la N-acétylglucosamine et l'asparagine. En outre, tous les glycannes possèdent une structure pentasaccharidique commune : le mannotriosido-di-N-acétylchitobiose lié à un résidu d'asparagine de la protéine (Fig.2, p. 6). Les glycannes des N-glycosylprotéines dérivent de la substitution de ce noyau pentasaccharidique par les monosaccharides les plus divers : galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, acides sialiques (Fig.3, p. 6). Cette substitution conduit à trois grandes classes de N-glycannes (Montreuil, 1975) :

- type oligomannosidique ou "high-mannose type",
- type N-acétyllactosaminique ou "complex type",
- Type mixte ou "hybride type",

Tableau I : Exemplaires de structures glycaniques rencontrées dans les mucines (d'après Sadler, 1984).

Structures
I. Ovine Submaxillary Type
NeuAc(α2-6)GalNAc(α1-0)Ser/Thr
II. Porcine Submaxillary Type
NeuAc(α2-6)
\
GalNAc(α1-3) GalNAc(α1-0)Ser/Thr
\ /
Gal(β1-3)
/
Fuc(α1-2)
NeuAc(α2-6)
\
GalNAc(α1-0)Ser/Thr
/
Fuc(α1-2)Gal(β1-3)
III. Rat Sublingual Type
NeuAc(α2-6)
\
NeuAc(α2-6) GalNAc(α1-0)Ser/Thr
\ /
NeuAc(α2-6) GalNAc(β1-4)GalNAc(β1-3)
\ /
GalNAc(β1-4)GalNAc(β1-3)
/
NeuAc(α2-4)GalNAc(β1-3)

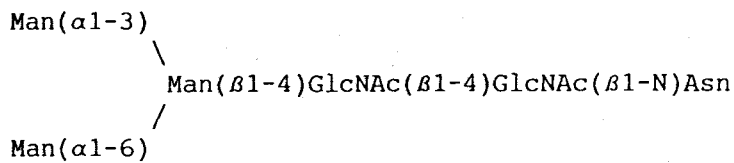


Figure 2. Noyau pentasaccharidique commun aux glycanes des N-glycosylprotéines (Montreuil, 1975).

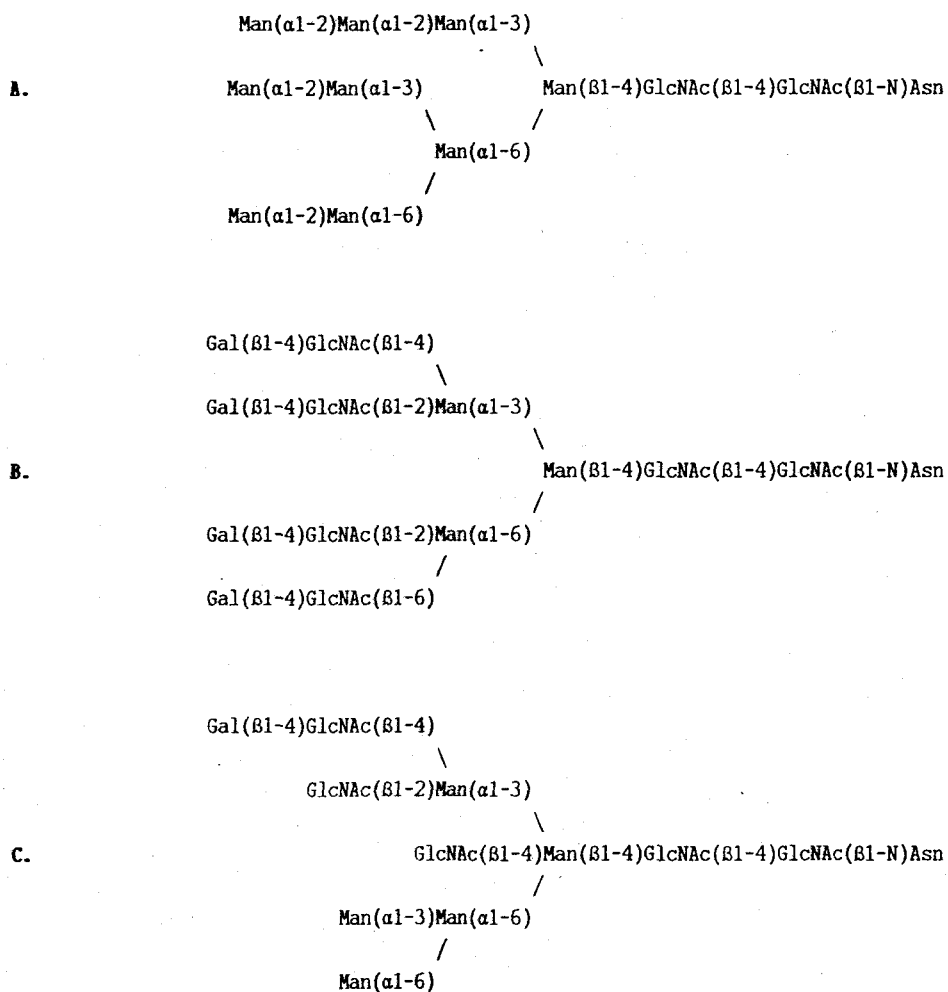


Figure 3 : Types fondamentaux de structures primaires de N-glycanes de glycoprotéines (Montreuil, 1975).

- A. Type oligomannosidique.
- B. Type N-acétyllactosaminique.
- C. Type mixte ou "hybrid type".

Les acides sialiques des N-glycosylprotéines.

Dans les glycanes des N-glycosylprotéines, les acides sialiques se trouvent généralement en position terminale non réductrice de la chaîne oligosaccharidique. Il peut être lié, soit en α -2,3 soit en α -2,6 (Fig.4, p. 8) et parfois en α -2,4 sur le galactose terminal (Montreuil, 1982; Montreuil, 1984) de la chaîne disaccharidique Gal- (β -1,3)GlcNAc. Il peut également être présent en α -2,6 sur le résidu de N-acétylglucosamine de ce motif comme par exemple dans la molécule de fibronectine bovine (Takasaki *et al.*, 1979) comme le montre la figure 5 (p. 9).

Enfin, l'acide sialique peut être lié sur un autre résidu d'acide sialique formant ainsi des oligomères linéaires de longueur variable. A cet égard, des enchaînements linéaires d'acide N-acétylneuraminique, reliés par des liaisons α -2,8 (Fig. 6, p. 10) ont été récemment mis en évidence dans les glycoprotéines membranaires NCAM (nervous cell adhesion molecules) qui interviennent dans l'adhésion de cellules nerveuses (Finne et Mäkela, 1985; MacCay *et al.*, 1985). Enfin, Fukuda *et al.* ont caractérisé la présence du disialoside NeuAc(α -2,9)NeuAc en position terminale de structures poly-N-acétyllactosaminiques de glycanes de cellules de carcinome embryonnaire humain (Fukuda *et al.* 1985).

3. Les glycosphingolipides.

Les glycosphingolipides sont composés de sphingosine, d'un résidu d'acide gras et d'un glycanne. La molécule formée par l'association sphingosine-acide gras, appelée céramide (cer), constitue le pôle hydrophobe des glycosphingolipides. La partie oligosaccharidique est liée sur la fonction alcoolique primaire de la sphingosine.

Les glycosphingosides sont classés en deux catégories (Kanfen et Hakomori, 1983) :

a. Les cérébrosides qui sont des glycosphingolipides neutres.

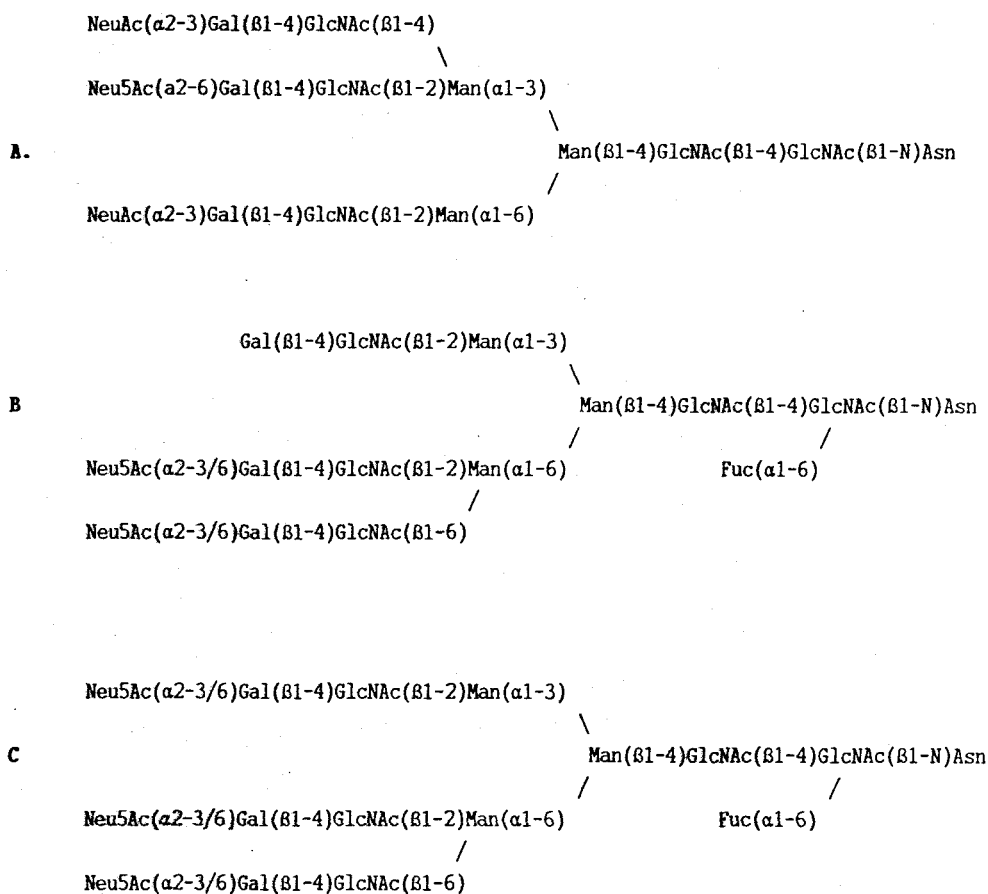


Figure 4. Exemples de structures glycaniques rencontrées dans les N-glycosyl-protéines.

- A:** Structure glycanique de la fétuine bovine (Nilsson *et al.*, 1979).
- B:** Structure glycanique de l'unité B du glycopeptide GP-3 de la thyroglobuline porcine (Kondo *et al.*, 1977; Krusius et Finne, 1981).
- C:** Structure glycanique de la glycoprotéine membranaire du virus de la stomatite (Reading *et al.*, 1978).

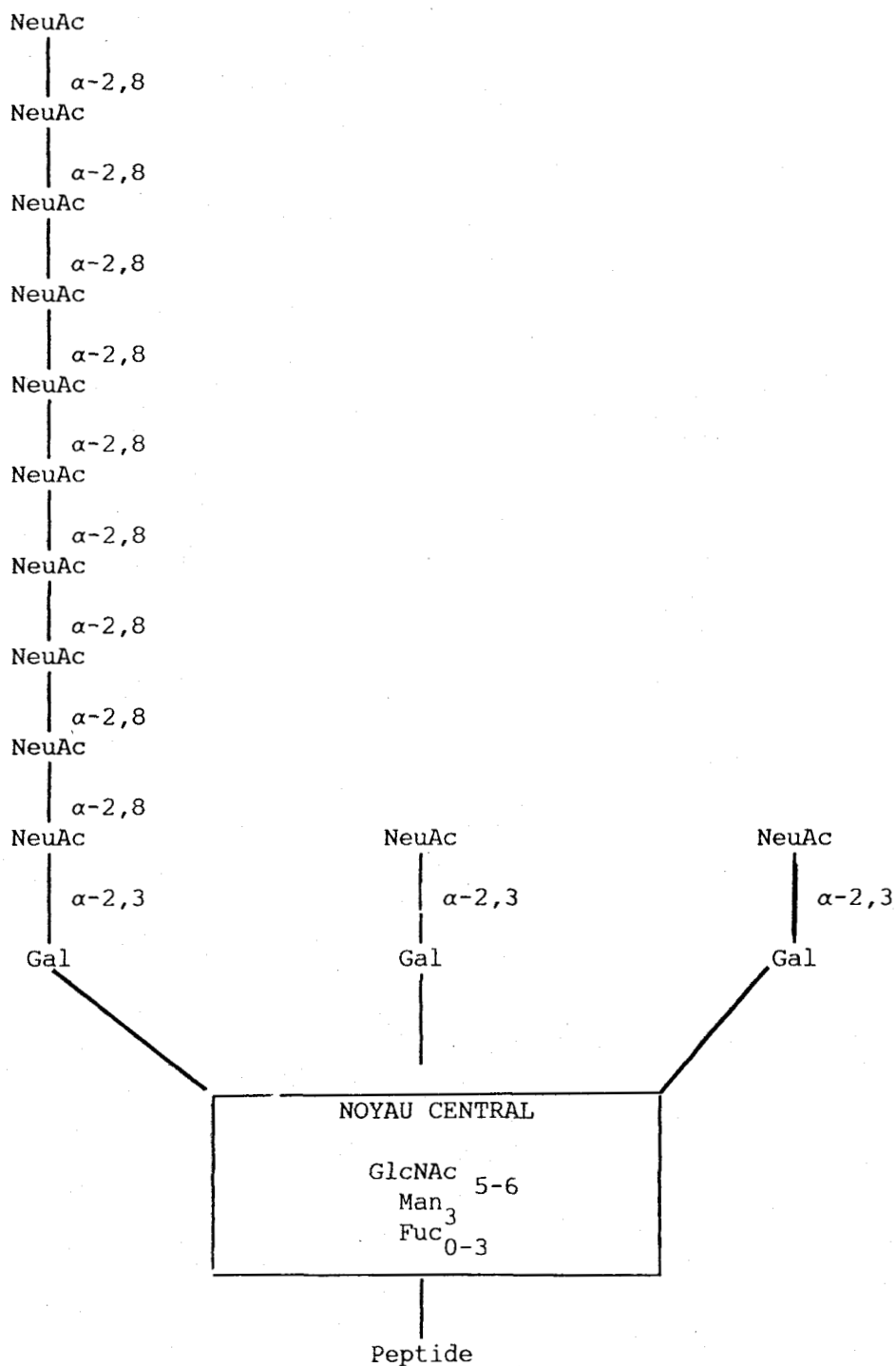


Figure 6. Schéma de structure des glycanes polysialylés isolés du cerveau.
Le glycanne est de type N-acétyllactosaminique tri- ou tétraantenné. La chaîne linéaire d'acide sialique, de longueur variable, contient au moins 12 résidus d'acide N-acétylneuraminique (Finne et al., 1985).

b. Les gangliosides qui sont sialylés et parfois fucosylés et qui se subdivisent en trois sous-classes (Tableau II, p. xx) :

- classe "ganglio"
- classe "lacto"
- classe "globo"

Les acides sialiques des gangliosides!

Au niveau des gangliosides, l'acide sialique peut être lié soit en α -2,3, soit en α -2,6 sur les résidus de galactose et en α -2,6 sur les résidus de N-acétylglucosamine. De plus, comme dans les glycannes polysialylés isolés des glycoprotéines cérébrales, on peut parfois trouver plusieurs acides sialiques liés entre eux par une liaison α -2,8 (Tableau II, p. 12).

C - Les acides sialiques des glycoconjugués membranaires.

L'acide sialique est un composé essentiel des glycoprotéines et des glycolipides des membranes cellulaires dont l'architecture est présentée dans la figure 7 (p. 13). Il joue en effet un rôle important dans la reconnaissance, l'adhésion et les interactions cellulaires d'une part, et dans la réponse à des agents extérieurs comme les virus, les hormones et des toxines d'autre part.

Il existe une corrélation étroite entre le comportement des cellules et la présence des sialoglycoconjugués de surface et les altérations de la sialylation sont souvent associées à des changements du comportement cellulaire.

Quelques exemples de glycannes de type N-acétyllactosaminique de glycoprotéines membranaires et de glycannes de O-glycosylprotéines membranaires sont données dans la figure 8 (p. 14).

Tableau II : Exemples de structures glycaniques rencontrées dans les gangliosides (d'après Hakomori, 1983).

Structure	Designation according IUPAC-IUB Recommendation	Short notation
Gangliosides of the ganglio-series		
Gal(β1-4)Glc(β1-)Cer 3 2αNeuAc	II ³ NeuAc-Lac-Cer	G _{lac} ¹ G _{M3}
Gal(β1-4)Glc(β1-)Cer 3 2αNeuAc(8-2α)NeuAc 8 2αNeuAc	II ³ NeuAc ₃ -Lac-Cer	G _{lac} ³ G _{T3}
Gangliosides of the lacto-series		
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc(β1- Cer 3 2αNeuAc	IV ³ NeuAc-nLacOse ₄ -Cer	
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc(β1- Cer 6 2αNeuAc(8-2α)NeuAc(8-2α)NeuAc	IV ³ NeuAc ₂ -nLacOse ₄ -Cer	
Gangliosides of the globo-series		
Gal(β1-3)GalNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(β1- Cer 3 2αNeuAc	V ³ NeuAc-GbOse ₅ -Cer	
Gal(β1-3)GalNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(β1- Cer 3 2αNeuAc(8-2α)NeuAc	V ³ NeuAc ₂ -GbOse ₅ -Cer	

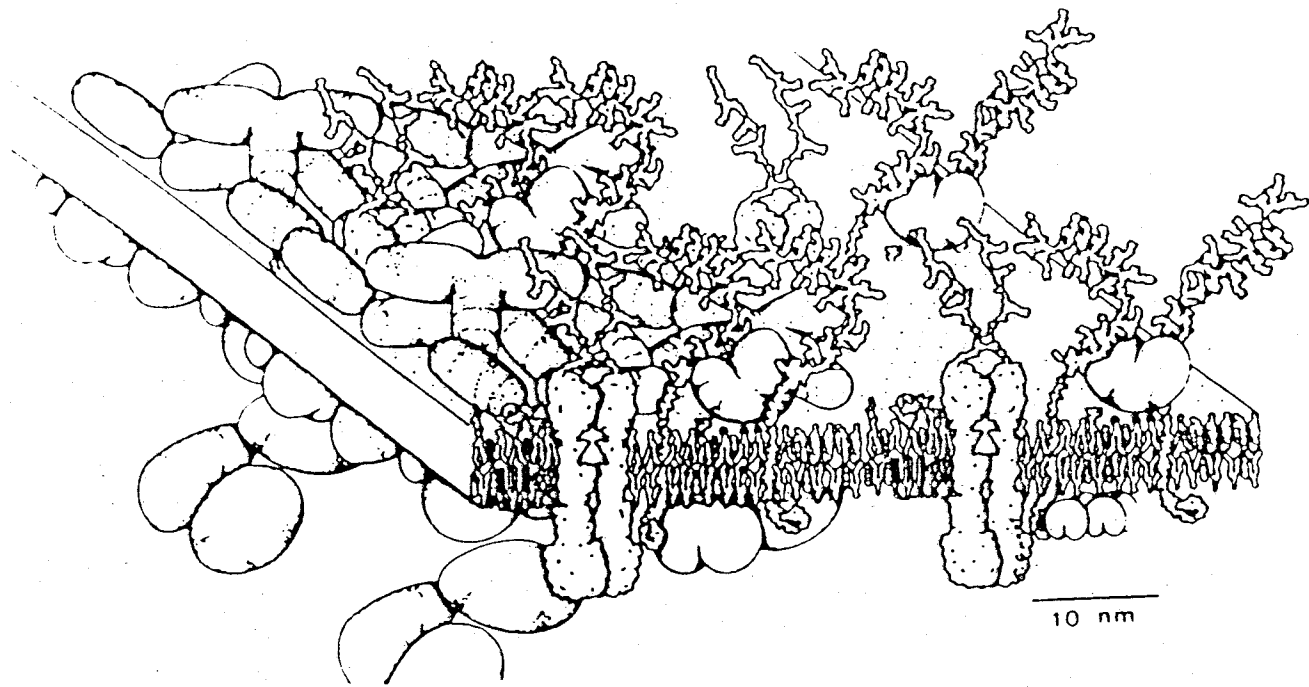


Figure 7. Modèle de la structure membranaire en mosaïque fluide (tiré de la revue de Grant et Peters, 1984).

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, constituées par les chaînes d'acides gras, dirigées vers la zone interne de la double couche lipidique.

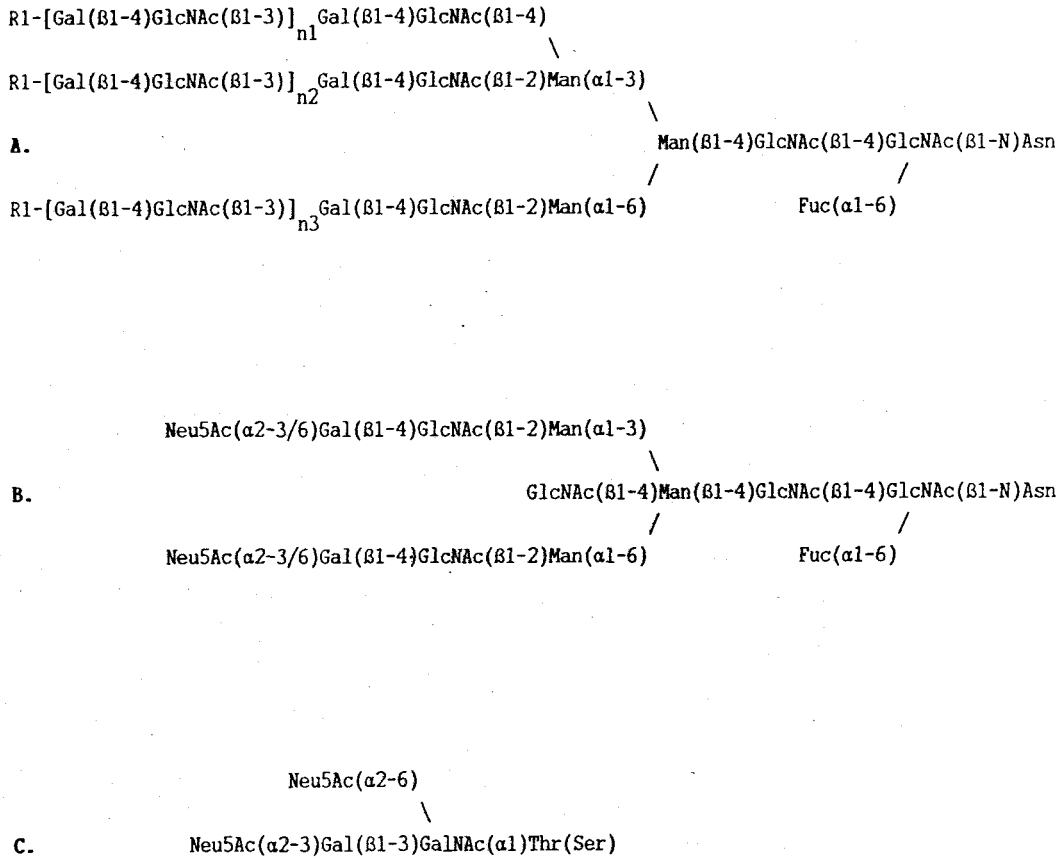


Figure 8. Structure de glycannes liés N-glycosidiquement et O-glycosidiquement sur la glycophorine et sur les glycoprotéines des "bandes 3 et 4" du globule rouge (d'après la revue de Fukuda et Fukuda, 1984).

- A. Type N-acétyllactosaminique présent dans les "bandes 3, 4 et 5" du globule rouge.
- B. Structure biantennée présente dans la glycophorine.
- C. Unité tétrasaccharidique présente dans la glycophorine.

II. METABOLISME DES ACIDES SIALIQUES.

A - Biosynthèse des acides sialiques.

La biosynthèse de l'acide sialique comporte plusieurs étapes et fait intervenir de nombreux enzymes. Elle est résumée dans les figures 9 et 10 (p. 16 et 17).

Elle passe par la chaîne du métabolisme des N-acétylhexosamines (Fig.9, p. 16) qui conduit au précurseur lointain des acides sialiques : l'UDP-N-acétylglucosamine.

B - Les processus de la sialylation.

1. Le précurseur.

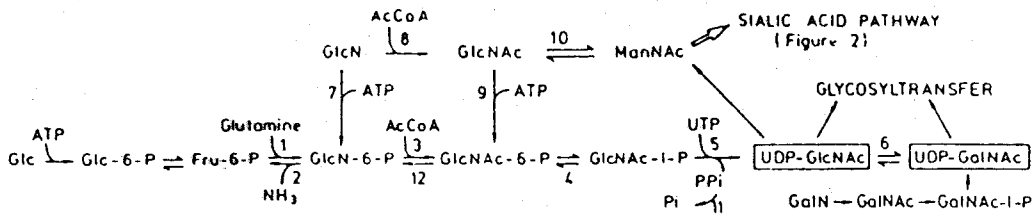
Le précurseur des acides sialiques est le cytidylmonophosphateuraminique (CMP- β -NeuAc) dont la biosynthèse est schématisée dans la figure 10 (page 17). Après la synthèse, diverses réactions le modifient : hydroxylation du groupement acétyle et passage à l'acide N-glycolylneuraminique et O-acétylation des groupements hydroxyles en position 4, 7, 8 et/ou 9 (Schauer, 1978).

2. Les sialyltransférases.

Les sialyltransférases (EC 2.4.99.1) sont des enzymes spécifiques chargées de transférer les acides sialiques sur différents accepteurs. La réaction générale s'écrit :

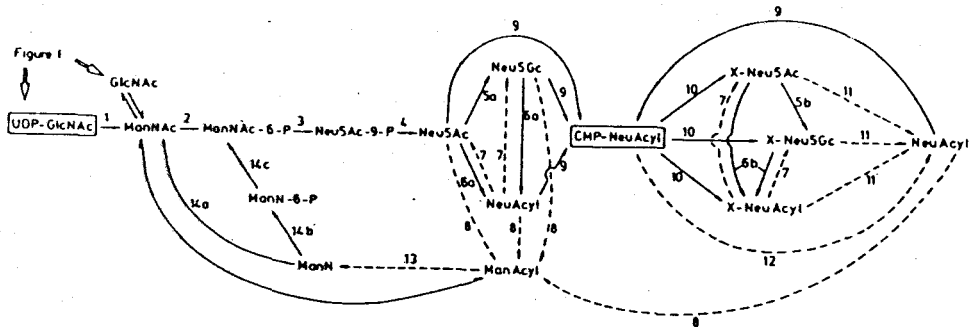


La spécificité porte à la fois sur l'anométrie de la liaison et sur la nature de l'accepteur. C'est ainsi que des sialyltransférases spécifiques des liaisons α -2,3, α -2,6 et α -2,8 ont été purifiées et que les sialyltransférases actives sur des structures N-glycosidiques sont inactives vis-à-vis de structures O-glycosidiques ou glycolipidiques. Des études par immuno-localisation ont permis de montrer que les activités sialyltransférasiques étaient localisées au niveau du trans-Golgi (Mauro et al., 1975; Berger et Mesford, 1985). Dès 1972, Mudgui et



No. Enzyme	EC	Substrats	Effecteurs	Localisation
1 glucosamine-6-phosphate synthétase	5.3.1.19	Fru-6-P, glutamine	Gluc-6-P, AMP, UTP, UDP-GlcNAc	cytosolique
2 glucosamine-6-phosphate désaminase	5.3.1.10	GlcN-6-P	GlcNAc-6-P	cytosolique membranaire
3 glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase	2.3.1.4	GlcN-6-P, AcCoA	-	cytosolique
4 N-acétylglucosamine-6-phospho-mutase	2.7.5.2	GlcNAc-6-P	-	cytosolique
5 UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase	2.7.7.23	GlcNAc-1-P, UTP	?	ctosolique ?
6 UDP-N-acétylglucosamine 4-épipimérase	5.1.3.7	UDP-GlcNAc	-	cytosolique
7 héxokinase/glucokinase	2.7.1.1/2.7.1.2	GlcN, ATP	-	cytosolique
8 glucosamine-N-acétyl-transférase	2.3.1.3	GlcN, AcCoA	?	cytosolique
9 N-acétylglucosamine kinase	2.7.1.59	GlcNAc, ATP	UDP-GlcNAc, GlcNAc-6-P	cytosolique
10 N-acétylglucosamine 2-épipimérase	5.1.3.8	GlcNAc	?	?
11 pyrophosphatase	3.6.1.1	PPi	-	cytosolique
12 N-acétylglucosamine-6-phosphate desacétylase	3.5.1.25	GlcNAc-6-P	?	?

Figure 9. Métabolisme des hexosamines de mammifères. La biosynthèse de novo de l'UDP-acétyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) à partir du D-glucose et les enzymes relatives sont décrites dans la figure et dans le tableau ci-dessus.



No.	Enzymes	EC Numéro	Substrats	Effecteurs	Localisation
1	UDP-N-acétylglucosamine 2-épimérase	5.1.3.14	UDP-GlcNAc	CMP-Neu5Ac	cytosolique
2	N-acétylmannosamine kinase	2.7.1.60	ManNAc-6-P, ATP	?	cytosolique
3	N-acétylneuramate-9-phosphate synthétase	4.1.3.20	ManNAc-6-P, PEP	?	cytosolique
4	N-acétylneuramate-9-phosphate phosphatase	3.1.3.29	Neu5Ac9P	?	cytosolique
5	N-acétylneuramate monooxygénase	1.44.99.18	a) NeuAc libre b) NeuAc lié	?	a) cytosolique b) golgienne
6	acylneuramate 4 ou 7 (9) O-acétyltransferase	2.3.1.44 2.3.1.45	a) NeuAcyl libre b) NeuAcyl lié AcCoA	?	a) cytosolique b) golgienne
7	acylneuramate estérase	3.1.1.?	4,7,8,9-NeuAcyl libre ou liée	?	membranaire ?
8	acylneuramate pyruvate-lyase	4.1.3.3	NeuAcyl	-	?
9	CMP-acylneuramate synthétase	2.7.7.43	NeuAcyl, CTP	CMP, PPi	nucléaire
10	sialytransférase	2.4.99.1	CMP-NeuAcyl, accepteur	CMP, + ?	golgienne et sérique
11	sialidase	3.2.1.18	Oligosaccharide complex sialylé	(-)?	membranaire, microsomiale, lysosomiale
12	CMP-acylneuramate hydrolase	3.1.4.40	CMP-NeuAcyl	UDP-GlcNAc	membranaire, sérique
13	N-désacétylase	3.5.1.?	ManNAc ManNGc	?	?
14	phosphorylation, acétylation (non-spécifique)	-	ManN, ManN-6-P AcCoA, ATP	?	cytosolique

Figure 10. Métabolisme des acides sialiques de mammifères. La formation et l'interconversion des acides sialiques sont présentées Fig. 9 (p. 16)

Schachter montraient que des extraits de foie de Rat catalysaient la synthèse de sialyl- α -2,3- et sialyl- α -2,6-lactose. L'activité β -galactosyl-(1-4)-N-acétylglycosaminide- α -2,3-sialyltransférase a été caractérisée dans différents tissus animaux et humains (Vanden Eijnden *et al.*, 1980) et, plus récemment, Weinstein *et al.* (1982) ont réussi à purifier deux sialyltransférases du foie de Rat. La première est une α 2-6-sialyltransférase qui transfère l'acide sialique sur le Gal(β -1,4)GlcNAc-R. La seconde permet l'incorporation d'acide sialique en α -2,3 sur la chaîne Gal(β -1,3)- ou Gal(β -1,4)GlcNAc-R, les structures O-glycosidiques ne sont pas des substrats pour ces enzymes (Weinstein *et al.*, 1982)

Paulson *et al.* (1978) ont comparé les cinétiques d'incorporation d'acide sialique, catalysée par l' α -2,6-sialyltransférase du foie de Rat sur l'asialo-orosomucoïde et l'asialo-transferrine. A faible concentration, l'enzyme est capable de sialyler totalement l'asialotransferrine, mais seulement 50 % des sites de l'asialo-orosomucoïde, la saturation nécessitant des concentrations en enzyme 20 fois plus élevées. Une enzyme tout à fait comparable a été purifiée du colostrum de Vache (Van den Eijnden *et al.*, 1980 ; Paulson *et al.*, 1977; Mesford *et al.*, 1984). Paulson *et al.* (1977) ont montré que cette enzyme reproduisait à l'évidence un mécanisme bi-bi aléatoire. Van den Eijnden *et al.* et Joziassse *et al.*, en utilisant des glycopeptides bi- et triantennés, ont montré la sialylation préférentielle de la branche GlcNAc(β -1,2)Man liée en α -1,3 sur le β -mannose, quel que soit l'accepteur utilisé et que l'activité enzymatique apparente diminuait lorsque le nombre d'antennes augmente. Cette spécificité d'action disparaît lorsque le résidu de N-acétylglycosamine du noyau central lié au β -mannose, est éliminé (Joziassse *et al.*, 1985). Enfin, selon Bendiak et Cook (1982, 1983), l' α -2,6-sialyltransférase purifiée du foie d'embryon de Poulet répondrait également à un mécanisme bi-bi aléatoire mais, contrairement aux observations faites par Joziassse *et al.*, la fraction glycopeptidique de l'orosomucoïde désialylée serait son meilleur accepteur.

Ces différents résultats montrent à quel point les sialyltransférases possèdent une haute spécificité d'accepteur et les difficultés rencontrées lorsque l'on s'attache à définir les interactions qui régissent la formation du complexe enzyme-substrat.

C - Catabolisme des acides sialiques.

1. Les sialidases.

L'hydrolyse des acides sialiques est catalysées par les sialidases (ou neuraminidases). Les sialidases sont une famille d'enzymes (N-acétylneuraminosyl glycohydrolase, EC 3.2.1.18) qui libèrent les acides sialiques substituant les glycoprotéines ou les glycolipides. Ces sialidases existent chez les microorganismes, les invertébrés et les animaux supérieurs. La spécificité des sialidases est fonction :

- anomérie de liaison,
- longueur de la chaîne oligosaccharidique,
- position de l'acide sialique sur la chaîne glycanique,

2. La sialidose.

Le terme de sialidoses regroupe un ensemble de maladies résultant d'un déficit héréditaire du catabolisme des sialyl-oligosaccharides et sialyl-glycoconjugués. Par exemple, les observations concernant l'excrétion anormal dans les urines de sialyl-oligosaccharides est associée à un déficit en α -neuraminidase chez les patients atteints de mucopolysaccharidose de type I et II. La découverte d'une déficience en neuraminidase dans les cultures de leucocytes et de fibroblastes et l'excrétion dans les urines d'oligosaccharides possédant une proportion élevée de liaison α -2,3 (Strecker et al., 1977; Strecker et Michalski, 1978) sont considérées comme un déficit en neuraminidase spécifique de la liaison α -2,3 chez ces patients.

III. ROLE DES ACIDES SIALIQUES.

Les acides sialiques substituent, en position terminale non-réductrice, les glycanes de nombreux glycoconjugués solubles ou membranaires. Il est rapidement apparu que ces composés pouvaient participer de manière active aux phénomènes biologiques régissant les fonctions cellulaires et ceci pour plusieurs raisons :

- Leur position terminale sur la chaîne oligosaccharidique.
- Le nombre élevé de substitutions possibles de l'acide neuraminique et la nature de la liaison sur l'oligosaccharide substitué, spécifiques de certaines espèces ou de certains tissus.
- Leur forte charge électronégative (la valeur de son pK avoisinant pH 2).
- Les modifications du comportement biologique des cellules et des molécules désialylées.

En fait, il est possible de distinguer cinq fonctions principales de l'acide sialique :

1 - Du fait de sa charge négative, il intervient au niveau de la fixation et du transport de composés chargés positivement et dans la formation d'agrégats cellulaires, par l'intermédiaire de ponts calciques, ou, inversement, interdit la formation de ces agrégats, par un effet de répulsion comme c'est le cas pour les érythrocytes.

2 - Il influence la conformation des glycoprotéines et agit de cette manière sur leur activité biologique et sur leur sensibilité vis-à-vis des protéases. A cet égard, il est parfois nécessaire au maintien de l'activité catalytique de certains enzymes. En outre, la résistance à la dégradation protéolytique a été mise en évidence pour de nombreuses glycoprotéines comme les mucines ou l'orosomucoïde.

3 - Les dérivés N-et O-acylés de l'acide neuraminique sont des déterminants antigéniques d'organismes unicellulaires et de mammifères

(Schauer, 1983) et ils contribuent également à la spécificité des groupes sanguins M et N (Sadler et al., 1979).

4 - L'acide sialique est le récepteur membranaire d'hormones peptidiques (insuline, gonadotrophine), de toxines (toxines cholérique et tétanique), de virus (Paulson et al., 1984; Paulson et al., 1979) des spermatozoïdes, ainsi que de certaines espèces de Mycoplasmes. L'infection des cellules eucaryotes par les virus nécessite une étape de fixation de ces agents infectieux sur la membrane de la cellule hôte et l'acide sialique des glycoprotéines membranaires participe dans certains cas à ces phénomènes de reconnaissance. Un exemple bien connu est l'infection de la cellule érythrocytaire par les myxovirus. Les résidus d'acides neuraminiques de la membrane des hématies jouent le rôle de récepteur vis-à-vis des lectines spécifiques de l'acide sialique des myxovirus (Paulson et al., 1979). Loomes et al. (1985) ont montré que *Mycoplasma pneumoniae* peut reconnaître une séquence poly-N-acétylactosaminique d'antigène d'hématie i/I. Cette lectine peut agglutiner fortement des hématies possédant la séquence Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, par contre, elle ne se lie que faiblement aux hématies désialylées.

5 - Inversement, l'acide sialique peut inhiber la reconnaissance d'un ligand par son récepteur ou d'un site antigénique (peptidique ou oligosaccharidique) par des anticorps. Il intervient alors comme un signal d'anti-reconnaissance et plusieurs exemples peuvent illustrer ce phénomène de masquage .

Une démonstration éclatante du rôle protecteur de l'acide sialique fut donnée par les travaux d'Ashwell et al. (1978). En effet, la désialylation des glycoprotéines circulantes, en dévoilant des résidus de galactose terminaux, provoque leur capture, leur internalisation et leur dégradation par les hépatocytes (Fig.11, p. 22). La fixation de ces asiologlycoprotéines s'effectue par l'intermédiaire d'une lectine spécifique des β -galactosides intégrée dans la membrane hépatocytaire.

Les cellules de Küpffer, les macrophages péritonéaux et spléniques, possèdent également un récepteur à galactose et sont responsables du catabolisme des érythrocytes âgés (Fig.12, p. 22) ou de certaines cellules tumorales circulantes (Kolb-Bachoffea et al., 1983). A cet égard, Kelm et al. (1986) ont montré que la re-sialylation enzymatique

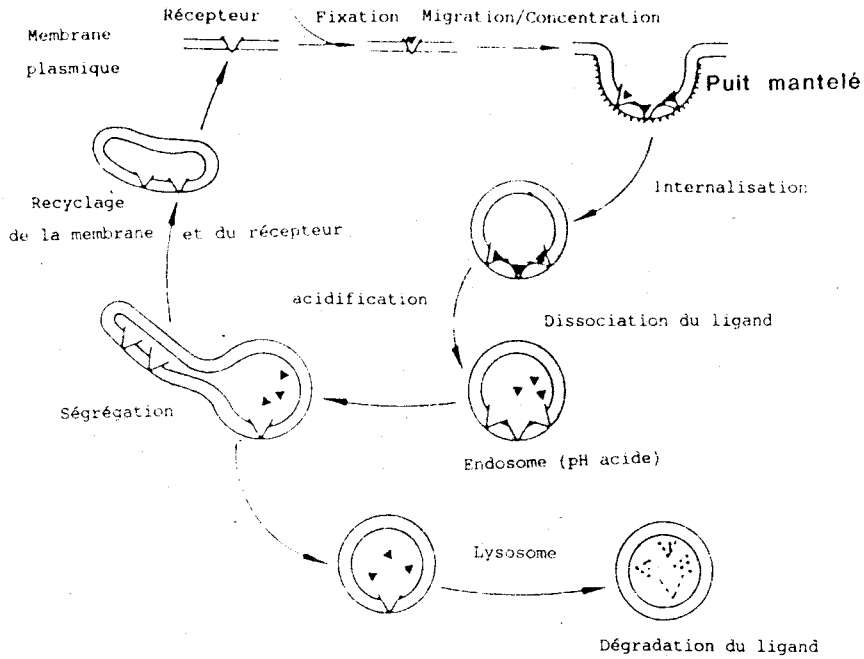


Figure 11. Représentation de l'endocytose et du catabolisme des asialoglycoprotéines dans l'hépatocyte par l'intermédiaire d'une lectine membranaire spécifique du galactose (Harford et al., 1984).

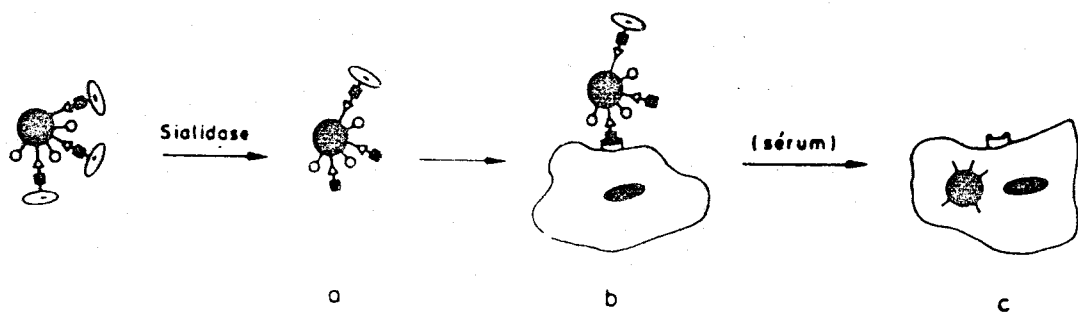


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme de la fixation et de la phagocytose des erythrocytes par les macrophages traités par la neuraminidase. ⊙ charge négative, ■ résidus du galactose, ○ composés membranaires, □ lectine spécifique du galactose à la surface du macrophage (Schauer, 1985).

d'érythrocytes préalablement traités par une neuraminidase diminuait la fixation de ces cellules à des macrophages péritonéaux (Kelm et., 1986).

La surface des cellules trophoblastiques est un exemple de l'effet de masquage des sites antigéniques par l'acide sialique. Il existe, en effet, à la surface de ces cellules une couche glycoprotéinique riche en acide sialique, agissant comme une barrière immunitaire entre la mère et l'embryon. On considère actuellement que la disparition totale ou partielle de l'acide sialique est l'une des causes de certaines maladies auto-immunes (Reutter et., 1982).

IV. ACIDES SIALIQUES ET TRANSFORMATION MALIGNNE.

La transformation maligne a pour conséquence de bouleverser le métabolisme cellulaire, affectant tous les compartiments cellulaires. En particulier, elle conduit à un profond changement des propriétés de la surface des cellules :

- Diminution de l'adhésion cellulaire qu'elle soit inter-cellulaire ou vis-à-vis du *substratum* (Coman, 1944).
- Perte de l'inhibition de contact (Todaro et Green, 1963; Leviane *et al.*, 1965)
- Perturbation de la perméabilité membranaire et des transports actifs (Pardee, 1975).

Dans la mesure où les glycoconjugués membranaires sont directement impliqués dans le comportement cellulaire (Lloyd, 1975), tout changement de ces molécules associées à la transformation maligne peut être lié au comportement anarchique des cellules transformées. Les modifications des glycoconjugués membranaires, initialement détectées par microscopie électronique, puis par l'augmentation de l'agglutinabilité par certaines lectines comme la concanavoline A ou la lectine de germe de blé, se manifestent différemment lorsque l'on s'adresse aux structures glycolipidiques ou glycoprotéiniques. En effet, on observe une simplification des structures glycolipidiques, et inversement, ces modifications structurales se traduisent par une augmentation de la taille des glycannes des N-glycosylprotéines. Cette augmentation de taille peut être due à différents phénomènes :

- augmentation de l'antennarisation.
- augmentation de la sialylation.
- augmentation de la proportion de structures contenant un résidu de N-acétylglucosamine en position intercalaire.

Parallèlement à ces modifications structurales s'associe une augmentation de l'activité de certaines glycosyltransférases comme la

N-acétylglucosaminyltransférase V ou la sialyltransférase (Pierce, et al, 1987; Warren et al, 1978).

A - Modifications des glycolipides.

Deux types de modifications structurales des glycanes des glycolipides de cellules transformées viralement ont été observés (voir les revues d'Hakomori, 1983, 1985) :

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

- Synthèse de glycolipides particuliers. A ce niveau, ces nouvelles structures peuvent être soit tout à fait absentes, soit en très faibles quantités dans les cellules de référence (Tableau III, p. 26).

B - Modifications des glycanes des glycoprotéines membranaires.

1. Augmentation de l'antennarisation.

Les travaux entrepris dans notre Laboratoire (Debray et al., 1983) sur les cellules BHK21/C13 et sur leurs homologues transformées par le virus du sarcome du Hamster (cellules BHK/HSV) ont montré une augmentation du nombre des antennes des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires des cellules transformées et ceci d'après leur comportement en chromatographie d'affinité sur ConA. Ces différences ont été retrouvées sur les glycanes des fibronectines secrétées par ces mêmes cellules (Delannoy et al., 1985) ce qui permet de penser que les systèmes glycosyltransférasiques de ces cellules sont affectés dans leur ensemble par la transformation virale.

La polyantennarisation a, par ailleurs, été retrouvée sur des cellules BHK transformées par le virus du polyome (Yamashita et al., 1984). Sur la base d'études structurales plus précises, le groupe de Kobata (1984) démontrait 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 13, p. 27). Cette

Tableau III : Modifications des glycanes des glycosphingolipides observées lors de la transformation maligne (Hakomori, 1983).

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 Lac-Cer ou Glc-Cer
- 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 paraglobosides (nLc_4), absents dans les cellules normales
- Type 5. Accumulation des gangliosides G_{D3} ou G_{D2}

B. Synthèse de nouveaux glycolipides.

- Type 6. Expression de l'antigène de Forssman (G_{b5})
- Type 7. Expression de nouveaux antigènes de groupe sanguin différent de ceux de l'hôte
- Type 8. Elongation linéaire des chaînes de résidus 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
-

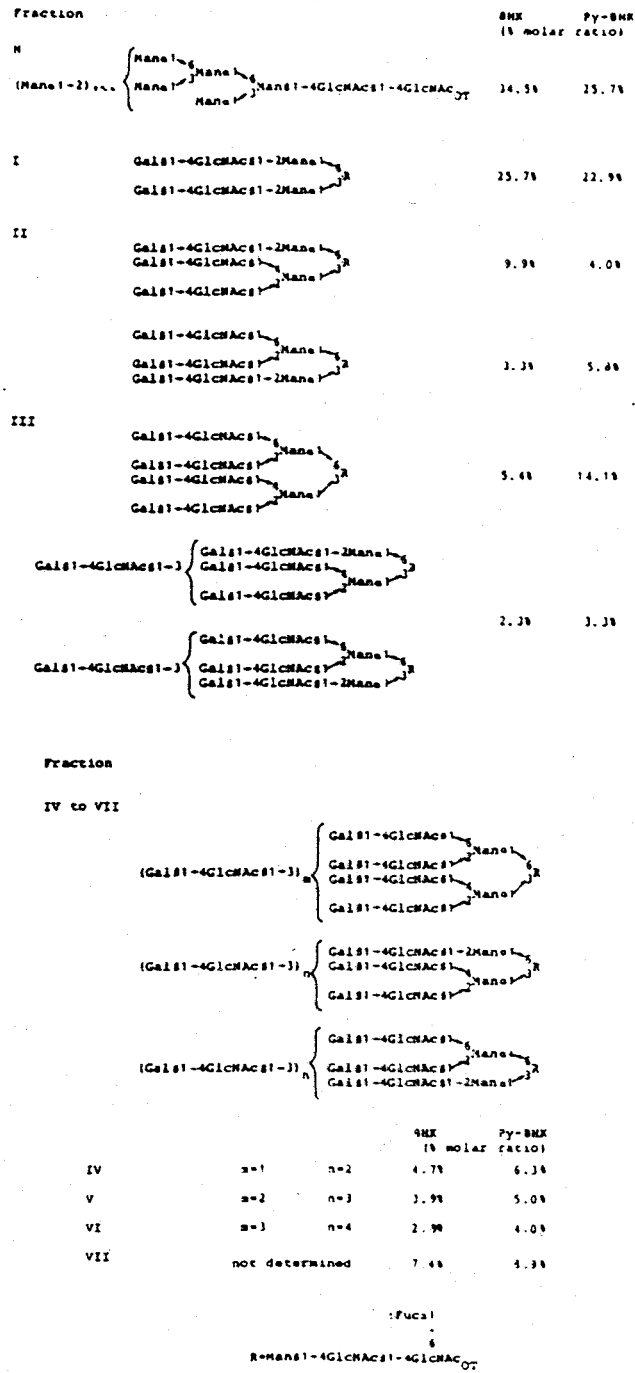


Figure 13. Structures des oligosaccharides membranaires de cellules normales (BHK) et transformées (Py-BHK). Les pourcentage sont calculés sur la base des radioactivités incorporées dans chaque fraction (Yamashita et al., 1984).

augmentation est associée à une activité plus élevée de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Yamashita et al., 1984).

La polyantennarisation a aussi été retrouvée sur des lignées transformées de cellules uro-épithéliales humaines (Debray et al., 1986), sur des cellules BHK transformées par le virus de sarcome de Rous qui contient l'oncogène *src* (Pierce et Arango, 1986), sur des fibroblastes NIL-8 transformés par le virus du sarcome du Hamster (Hubbard, 1987) ou encore sur des fibroblastes murins NIH-3T3 transformés *in vitro* par l'oncogène *c-Ha-ras* activé, ainsi que sur des cellules BHK transformées par le même oncogène (Cazlaris, H., communication personnelle).

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

Aux vues de ces différents résultats, il apparaît que l'antennarisation en β -1,6 pourrait être un marqueur métastatique.

2. Augmentation de la proportion de glycanes possédant un résidu de N-acétylglucosamine en position "intercalaire".

En 1983, Kobata et coll. ont montré que lors de l'étude la gamma-glutamyl transpeptidase de foie de Rat, l'apparition d'une proportion importante de glycanes possédant un résidu de N-acétylglucosamine en position "intercalaire" sur la glycoprotéine isolée de foie hépatomateux, ces structures étaient absentes de l'enzyme isolé du foie normal (Yamashita et al., 1983).

3. Augmentation de la sialylation.

Parallèlement à la polyantennarisation, la transformation maligne conduit généralement à une augmentation de la sialylation. En outre, le fait que certaines lectines comme la WGA permettent de sélectionner à

partir des cellules transformées à haut pouvoir métastatique, des mutants résistants faiblement métastasants, a conduit à associer l'hypersialylation au phénomène de métastase. Cependant, le rôle de la sialylation dans la métastase reste encore controversé (voir les revues de Nicolson, 1982; Schirmacher et al., 1982), bien qu'une preuve de l'implication directe de l'acide sialique ait été apportée par Yogeewaran et Salk (1986). Selon ces auteurs :

- le pouvoir métastatique est accompagné d'une augmentation de la sialylation,
- le degré de sialylation des cellules traitées par la neuraminidase peut être corrélié au pouvoir métastatique.

A l'inverse, Passantiti et Hart (1988), utilisant le CMP-[³H]-NeuAc et l'(α -2,3)Gal(β -1,3)GalNAc sialyltransférase comme sonde pour déterminer la degré de sialylation à la surface de cellules traitées par la neuraminidase, ont montré que la cellule tumorigène B16-LM3/G3.12, non métastatique, contient 4 fois plus de sites sialylés en Gal(β -1,3)GalNAc que la cellule à haut pouvoir métastatique. Toutefois, ils n'ont pas trouvé de corrélation entre la quantité d'acide sialique et le pouvoir métastatique de ces cellules.

Par ailleurs, des variants cellulaires du mélanome B16, résistant à la WGA et présentant une tumorigénicité réduite, ont été décrits par Pinnaduwege et al. (1986). Une autre étude (Altevogt et al., 1983) a permis de mettre en évidence des différences de fixation de diverses lectines spécifiques de l'acide sialique sur la surface cellulaire de lignées à potentiel métastatique variable, indiquant que les modifications de la sialylation étaient corréliées à la progression tumorale.

4. Activité sialyltransférasique des cellules transformées.

L'augmentation de la sialylation des cellules transformées s'accompagne généralement d'une augmentation des activités sialyltransférasiques. Dès 1972, Warren et al. suggèrent l'existence d'une sialyltransférase spécifique des cellules transformées. Consécutivement, Bosmann et al. (1973) montraient qu'une lignée

cellulaire murine à haut pouvoir métastasant (Mélanome B16 de Souris) avait une activité ecto-sialyltransférase sensiblement plus élevée que son homologue à faible pouvoir métastasant et associaient ces différences d'activité au pouvoir métastasant des tumeurs. Depuis, de nombreuses études ont porté sur la comparaison des activités sialyltransférases de cellules normales et cancéreuses et il apparaît généralement une augmentation sensible de l'activité sialyltransférase dans les cellules tumorales (Warren *et al.*, 1972). Quelques études ont pourtant amené les auteurs à des conclusions plus nuancées voire opposées. Ces exemples sont toutefois trop peu nombreux pour être pris en considération.

V. CONCLUSIONS.

Les acides sialiques sont des composés essentiels des glycoconjugués des membranes cellulaires. En effet, nous avons vu qu'ils participaient directement aux activités biologiques de la surface cellulaire au niveau de l'adhésion intercellulaire et de la reconnaissance des molécules biologiquement actives.

La modification des propriétés adhésives, invasives et métastatiques des cellules transformées apparaît comme étant en relation avec la sialylation des glycanes des glycoconjugués membranaires. En effet, l'augmentation de la sialylation est un phénomène généralement observé dans les cellules tumorales et il semblerait, aux vues de certains résultats, que la quantité d'acide sialique soit en relation directe avec le pouvoir métastatique de ces cellules.

Parallèlement, la transformation conduit également à des modifications de la substitution des acides sialiques. Par exemple, l'augmentation des dérivés O-acétylés de l'acide neuraminique a été observée dans des lymphocytes tumoraux humains (Holzhauser et Faillard, 1988). Cependant, la signification biologique de ces substitutions reste encore mal connue. De même, la forme N-glycolylée de l'acide neuraminique est actuellement considéré comme un marqueur de la différenciation de l'intestin de Rat (Bourbourg et Bourbourg, 1983). Enfin, Ce même composé, qui n'existe normalement qu'en très faible proportion dans les cellules humaines, vient sa concentration fortement augmentée dans les tumeurs du colon (Higashi et al., 1985; Hirabayashi et al., 1987).

Aux vues de ces connaissances, nous avons entrepris l'étude de la sialylation de plusieurs modèles cellulaires transformées présentant en particulier, des différences de tumorigénicité, afin d'établir une corrélation entre ces deux phénomènes.

TRAVAUX PERSONNELS

I. MODELES EXPERIMENTAUX.

Notre recherche des modifications des glycoconjugués associées à la transformation maligne a été effectuée sur plusieurs modèles expérimentaux :

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

Ce carcinome, métastatique au poumon, a été découvert par Margaret R. Lewis en 1951 chez la Souris C57BL6. Une lignée dérivée (Dus et al., 1985) de ce carcinome (cellules LL2) a été étudiée au laboratoire. Nous avons choisi de sélectionner différents variants cellulaires résistants à l'action toxique de certaines lectines (Stanley, 1984). Ces variants présentent généralement des altérations importantes de la biosynthèse et de l'expression des glycoconjugués membranaires et leur intérêt dans l'étude des conséquences biologiques de ces liaisons est considérable.

Un taux élevé d'acide sialique à la surface cellulaire semble en relation directe avec le pouvoir métastatique des cellules (Yogeeswaran et Salk, 1981). 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 Katlie, 1979; Monsigny et al., 1980); 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 Debray et Montreuil (1989) viennent d'isoler et de caractériser, a été réalisée par Debray et al. (1989).

Les propriétés biologiques des différents variants cellulaires résistants à l'action des lectines sont étudiées par Debray et al. (1989).

B - Cellules uro-épithéliales humaines normales et cancéreuses.

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, 1984; Christensen et al., 1984). En collaboration avec l'Institut Fibiger à Copenhague et le Département d'Immunologie des tumeurs de l'Institut Hinzfeld de Wroslaw, Pologne, nous avons examiné l'expression des glycanes membranaires de sept lignées de cellules uro-épithéliales afin d'établir certaines relations entre cette expression et le caractère tumorigène *in vivo* et invasif *in vitro* de ces cellules.

C - Modèle BHK - BHK/HSv.

Les cellules BHK sont des fibroblastes de rein de Hamster syrien nouveau né *Mesocricetus aureatus*, établies en lignée (BHK 21) depuis 1961 (Macphenson et Stoken, 1962). Afin d'étudier la modification des acides sialiques associés à la transformation maligne de ces cellules, nous avons d'abord choisi le fibroblaste de rein de Hamster (BHK 21/C13) 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 (BHK 21/C13-HSv) (Zavada et Mac Pherson, 1970) morphologiquement très différent des cellules BHK 21/C13 et tumorigène chez le Hamster.

Des études comparées de la glycosylation de ces deux types cellulaires ont été menées au Laboratoire (Debray et al, 1983 ; Delannoy et al, 1985). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la multi-antennarisation des glycanes membranaires liés à l'asparagine chez la cellule transformée, ainsi que des glycanes des fibronectines sécrétées dans le milieu de culture (voir la revue de Montreuil, 1987).

D - Modèle de fibroblastes murins NIH-3T3.

Ce modèle a été introduit au Laboratoire par le Dr. Cazlaris et fait appel à la transformation cellulaire par transfection d'oncogènes.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du professeur D. Stehelin, à l'Institut Pasteur de Lille.

Les effets du gène ras sur les cellules NIH 3T3 (Tableau IV, p. 35) ont été étudiés *in extenso* par différents groupes (voir les revues de Barbacid, 1987 et de Chamber et Tuck, 1988).

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

- Par Santer *et al.* (1984) qui furent les premiers à décrire des modifications affectant les N-glycosylprotéines membranaires après transfection de ras dans les cellules NIH 3T3.

- Par Matyas *et al.* (1987) qui ont détecté des modifications des glycolipides dans ce même système

- Plus récemment, par Bolscher *et al.* (1988) qui ont rapporté l'effet du gène ras sur la glycosylation de deux glycoprotéines cellulaires.

II. CELLULES ET CONDITIONS DE CULTURE

A - Condition de culture.

La lignée cellulaire LL₂ du carcinome pulmonaire de Lewis parvient d'une tumeur primaire en croissance sc dans la souris c57BL/6 (Dus *et al.*, 1985)

Les cellules croissent en monocouche dans EMEM contenant 10 % de serum de Veau foetal, 2 mM L-glutamine et des antibiotiques à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % CO₂, 95 % air comme écrit précédemment (Dus *et al.*, 1985). Les cellules sont implantées à une concentration de $2 \cdot 10^4$ cellules / cm² et se divisent à une densité de $1,2 \cdot 10^5$ cm². Ces chiffres sont utilisés pour estimer le temps de doublement de la population. Les cellules sont récoltées par agitation du flacon pour éviter toute possibilité d'altération des structures de la surface cellulaire après traitement protéolytique.

Le nombre de cellules est estimé par comptage dans un hémocytomètre et la viabilité par exclusion du colorant bleu trypan. La coloration par le fluorochrome de Hoesch 33228 a montré que les cellules n'étaient pas contaminées par les mycoplasmes.

Tableau IV : Effets cellulaires de l'oncogène ras (Cambers et Tuck, 1988)

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

B - Clonage dans un milieu semi-solide.

Les cellules "mono-dispersées" sont placées en agar 0,3 % semi-solide EMEM medium contenant 15 % de sérum de Veau foetal. Des aliquots de 0,5ml contenant de 200 à 500 cellules par puit sont étalés sur une plaque de culture de tissu de 24 puits et incubés 8-10 jours. Après incubation, les colonies de plus de 50 cellules sont comptabilisées.

C - Sélection des variants lectines-résistants.

Les variants sont isolés de la lignée LL₂ par sélection de cellules capables de croître en présence d'une concentration normalement toxique en lectine. Les lectines utilisées sont la WGA, la RCA_{II} et l'AAA, avec des spécificités respectives en sucre simple pour GlcNAc, Gal et Fuc. Toutes les lectines ont été préparées au Laboratoire (Debray et al., 1981 ; Debray et Montreuil, 1987). Les solutions mères de lectines sont préparées dans le PBS et sont filtrées sur membrane Millipore (porosité de 0,22 µm) et conservées à 4°C. Afin de déterminer la concentration minimale en lectines nécessaire pour éliminer la majorité des cellules parentales, les cultures sont réalisées dans des plaques de 24 puits de culture à une concentration initiale de 10³ cellules dans 0,5 ml de milieu de croissance par puit. Une double dilution des solution de lectine est ajoutée et les cellules sont incubées 7 jours. A la fin de l'incubation, la croissance des cellules est évaluée et la première concentration en lectines inhibant la croissance cellulaire est choisie comme première sélection.

Les cellules LL₂ (10⁶ cellules) sont étalées dans des flacons de 25 cm². après plusieurs heures, la lectine est ajoutée et les cultures sont incubées en présence de lectines. Le milieu sélectif est changé tous les trois jours. Après 10-14 jours, les cultures sont examinées et ceci avec le milieu contenant la lectine est remplacée dans un milieu de croissance normal et les cellules restantes sont remis en culture. La procédure est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'effet visible de la concentration en lectine sur la croissance des cellules. La sélection suivante est faite en utilisant une dose plus élevé de lectine. Le procédé de sélection est appliqué jusqu'à ce que la concentration limite

en lectine soit atteinte. Les concentrations en lectines sélectionnées sont : 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour la WGA, 0,01 à 1 $\mu\text{g/ml}$ pour la RCA_{II} et 1 à 10 $\mu\text{g/ml}$ pour l'AAA.

Les variants obtenus durant les sélections sont : LL₂⁵ (résistant à 20 $\mu\text{g/ml}$ de WGA, sélectionné après 5 cycles de traitement lectinique), LL₂⁸ (résistant à 100 $\mu\text{g/ml}$ de WGA sélectionné après 8 cycles de traitement), LL₂³⁰ (résistant à 100 $\mu\text{g/ml}$ de WGA sélectionné après 30 cycles), LL₂^{RCA_{II}} (résistant à 1 $\mu\text{g/ml}$ de RCA_{II}, sélectionné après 12 cycles) et LL₂^{AAA} (résistant à 10 $\mu\text{g/ml}$ de AAA, sélectionné après 10 cycles.)

Les cellules sont considérées résistantes si plus de 50 % d'entre elles survivent et sont capables de croître en présence d'une concentration donnée en lectine dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour estimer la toxicité lectinique.

Après isolement des sous-lignées cellulaires, le stock de départ est congelé dans l'azote liquide. Les autres expériences sont faites sur des cellules n'ayant pas passé plus de 2 mois *in vitro*. La résistance lectinique des variants obtenus reste relativement stable durant la durée des expériences.

D - Extraction des lipides des membranes cellulaires.

Les cellules en culture sont lavées trois fois par le PBS. Les culots obtenus après centrifugation sont extraits trois fois par 2 ml de mélange Chloroforme/Méthanol (2/1 ; V/V). Le surnageant est récupéré après centrifugation et le culot est extrait 3 fois par 2 ml de Chloroforme/Méthanol (1/1 ; V/V) et enfin 3 fois par 2 ml de Chloroforme/Méthanol (1/2 ; V/V). Tous ces surnageants sont rassemblés.

Le dosage de l'acide sialique total est ensuite effectué sur la fraction lipidique constituée par les surnageants des 3 extractions et sur le culot contenant les protéines et glycoprotéines.

E - Libération de l'acide neuraminique des glycanes.

Les procédés de libération des acides sialiques consiste à couper la liaison α glycosidique unissant l'acide sialique et le reste de la

chaîne glycanique. Pour cela, deux méthodes sont généralement utilisées : l'hydrolyse acide (Schauer et al., 1975 ; Schauer, 1978) et la méthanolyse (Yu et Ledeen, 1970).

1 - L'hydrolyse acide.

Après lavage par le PBS, les cellules (10^6) sont lyophilisées puis soumises à une hydrolyse acide dans de 0,5 ml d'HCl 0,1 N à 80 °C pendant une heure. L'hydrolysate est ensuite neutralisé par addition de 50 µl de NaOH 1N. Les cellules sont alors éliminées par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min et le dosage de l'acide sialique est réalisé sur le surnageant après lyophilisation par la méthode de Warren (1959) (décrite § F.1., P. 38).

ou par la technique d'HPLC préconisée par Powell et Hart (1986)

2 - Méthanolyse.

Les cellules lyophilisées sont méthanolysées par addition de 1 ml d'HCl 0,1 N dans le méthanol anhydre. La réaction est effectuée à 80°C pendant une heure. Le méthanolysate est neutralisé à l'aide de carbonate d'argent (AgCO_3). Après élimination des cellules par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min, une N réacétylation est réalisée par 10µl de anhydride acétique pendant une nuit à température ambiante et à l'obscurité. Après élimination par centrifugation du chlorure d'argent formé et du carbonate d'argent en excès, le surnageant est délipidé par l'heptane puis la phase méthanolique est évaporée sous azote. Les acides neuraminiques, libérés sous forme de dérivés monométhylés, sont dissous dans 1 ml d'eau puis lyophilisés afin de permettre de perméthylation ultérieure (décrite § G., P. 39).

F - Dosage de l'acide neuraminique libéré.

1 - Méthode de Warren.

Le lyophilisat issu de l'hydrolyse acide est dissout dans 40 µl d'eau, additionnée de 20 µl de métapériodate de sodium à 10 % dans H_2PO_4 9M. Après 20 minutes de réaction, 0,1 ml arsénite de sodium à 10 % dans H_2SO_4 0,1N sont ajoutés lentement. Dès la disparition de la coloration jaune, 0,6 ml de réactif de TBA (l'acide thiobarbiturique) à 6 % dans

Na_2SO_4 1,2N sont mélangés au milieu réactionnel. Celui-ci est placé au bain-marie à 100°C pendant 15 min, puis après refroidissement dans la glace, 1 ml d'HCL à 5 % dans le n-butanol est ajouté. Après agitation du mélange et centrifugation, une phase organique apparaît contenant le chromogène de l'acide formylpyruvique.

2 - Utilisation de la technique d'HPLC.

A partir de la méthode de Warren, Powell et Hart (1986) ont mis au point une méthode utilisant la technique d'HPLC en phase inverse sur une colonne Micropack C_{18} (5 μm , 250 x 4,6 mm) munie d'une précolonne Bio-Rad BioSIL ODS-55 (40 x 4,6 mm). La détection est réalisée à 549 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Kratos Spectroflow 757 ; L'enregistreur-intégrateur est de type spectra Physics 4100. L'élution est effectuée de façon isocratique par le mélange suivant: Tampon A (2,35 ml d'acide phosphorique, 28,1 g de perchlorate de sodium, QSP 1 l H_2O)/Méthanol/ H_2O dans le rapports 5/3/1 (V/V). Le débit est de 1 ml/min.

G - Identification de l'acide N-acétylneuraminique et N-glycolylneuraminique par analyse en CPG après méthylation.

La microméthylation est réalisée selon un protocole décrit par Finne *et al.* (1982).

Le lyophilisat des dérivés de l'acide neuraminique monométhylés est dissous dans 100 μl de DMSO et placé dans un bain ultrasonique pendant 45 min. 100 μl de Butyl lithium est ajoutée à cette solution qui est de nouveau placée au bain ultrasonique pendant 1 heure. Après congélation, 200 μl d'iodure de méthyle sont ajoutés et l'alkylation se déroule pendant une heure sous agitation au bain ultrasonique. Toutes ces opérations sont effectuées sous atmosphère d'azote.

La méthylation est arrêtée par addition de 1 ml d'eau. 1 à 2 cristaux de thiosulfate de sodium sont ajoutés pour décolorer la solution. Les dérivés perméthylés sont extraits par 3 fois 500 μl de chloroforme. Les phases organiques sont lavées 5 fois par 2 ml d'eau puis évaporées sous courant d'azote et lyophilisées.

Le résidu sec est dissous dans 30 μl de méthanol distillé. L'identification des acides sialiques méthylés est effectuée par

couplage CPG-SM. La chromatographie est réalisée sur colonne capillaire imprégnée de silicone OV-101 (25 m x 0,32 mm) à une température programmée de 110°C à 240 °C à raison de 10°C/min. Le spectromètre de masse est de type Riber-Mag 10-10. L'étude est faite par impact électronique (énergie d'ionisation : 70 eV)

H - Identification et dosage des monosaccharides sous forme de méthylglycosides trifluoroacétylés.

La méthode a été décrite par Zanetta et al (1972). Après lavage par le PBS, les cellules (10^6) sont lyophilisées en présence de 1 µg de Mésoinositol. L'extrait lyophilisé est méthanolysé pendant 24 h à 80°C par 1 ml d'HCL 0,5N dans le méthanol anhydre. Après élimination des cellules par centrifugation, le surnageant est filtré puis délipidé par l'heptane. La phase méthanolique est alors évaporée sous courant d'azote et les sucres libérés sont trifluoroacétylés par 100 µl du mélange dichlorométhane /anhydride trifluoroacétique dans les rapport 1/1 (V/V) pendant 2 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué par 200 µl de dichlorométhane et analysé en chromatographie de phase gazeuse dans les conditions suivantes : appareil de chromatographie Shimadzu GC-14A muni d'un détecteur à capture d'électron, colonne capillaire imprégnée de silicone OV 101, température programmée de 80°C à 220°C (à raison de 3°C par minute, débit du gaz vecteur hélium 20 ml/min).

I - Identification des glycoprotéines membranaires par des lectine radiomarquées.

1 - Radio-iodation des lectines.

Le marquage des lectines par l' ^{125}I est réalisé par la méthode à l'Iodogene (1.3.4.6-tétrachloro 3d,6d-ddiphénylglycoluril, PIERCE) décrite par Fraker et Speck (1978).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100µg d'Iodogene mis en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg/ml, après évaporation du chloroforme par un courant d'azote. Le marquage est effectuée par 2 µl d'IMS30 ^{125}I (5 mCi/50 µl ; Amersham) mélangés à

8 μ l de NaI froid 20mM dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4.

La solution de lectine (300 μ l à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 50mM, pH7,4) est placée dans le tube contenant l'Iodogene. La solution d' 125 I radioactive est alors ajoutée et le tube est placé dans la glace, sous agitation douce, pendant 10 min.

Les lectines marquées sont séparées de l'iode en excès par dessalage sur une colonne de Séphadex G-25 ou Bio-Gel P2 équilibrée dans le PBS.

Le comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote est effectuée par un compteur à scintillation (Compugamma, LKB).

2 - Solubilisation des protéines membranaires.

10^6 cellules sont mises en suspension dans 200 μ l de tampon phosphate de sodium, pH 7,4 , Triton X100 1 %, aprotinine 2 μ g/ml, 1,10-phenantroline 1 mM, PMSF 0,02 mM, DTT 1 mM, pepstatine 10 μ g/ml.

La solubilisation des protéines membranaires est réalisée à 4°C pendant 30 min sous agitation, puis la solution est centrifugée à 1500 rpm pendant 15 min. Un volume équivalent de tampon de tampon Tris/HCL 0,3 M p^H 8,9; 5 % S.D.S.; 5 % β -mercapto-éthanol; 20 % glycérol contenant du bleu de bromophenol comme marqueur de migration est mélangé avec le surnageant.

3 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. est effectuée selon la technique de Laemmly (1970).

Nous avons utilisé comme gel de séparation un gradient de polyacrylamide de 5 à 25 %, le gel de concentration étant à 5 %. La masse moléculaire est déterminée par rapport à un mélange de protéines témoins provenant de la firme Pharmacia "Low Molecular Weight Calibration Kit Proteins", Composition et masse moleculaire: la phosphorylase b (94.000), l'albumine (67.000), l'ovalbumine (43.000), l'anhydrase carbonique (30.000), l'inhibiteur tryptique (20.100) et la lactalbumine (14.000).

Avant l'injection, les échantillons sont portés à ébullition

(100 °C) pendant deux minutes. Après l'électrophorèse, les protéines sont soit colorées par le Bleu de Coomassie, soit transférées sur feuille de nitrocellulose.

4 - Visualisation des glycoprotéines par incubation avec les lectines radio-marquées.

Les protéines séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide, sont ensuite transférées par électrotransfert (cellule de transfert Biorad) sur une feuille en nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25mM, glycolle 192 mM, pH8,4 contenant 20 % de méthanol (V/V) selon la méthode décrite par Towbin *et al.* 1979 et Burnette (1981). L'électrotransfert est réalisée à 120 mA à 4°C pendant une nuit.

Afin d'augmenter la sensibilité de l'autoradiographie, nous avons utilisé le polyvinylpyrrolidone comme réactif de "quenching" selon la technique de Bartles et Lubbard (1984).

Après électrotransfert, la feuille de nitrocellulose est pré-incubée avec 2 % (P/V) de polyvinylpyrrolidone dans le PBS à température ambiante pendant 30 minutes. Cette solution est ensuite remplacée par un tampon PBS contenant 2 % (P:V) de polyvinylpyrrolidone et de 6×10^4 à 6×10^5 cpm/ml de lectines marquées. Après incubation à 4°C pendant 3 à 5 heures, la feuille de nitrocellulose est rincée quatre à cinq fois par du PBS contenant 2 % (P:V) de polyvinylpyrrolidone de la fin du rinçage, la feuille de nitrocellulose est séchée et les bandes marquées sont visualisées par autoradiographie à -70 °C pendant 0,5-15 heures en utilisant un film Kodak XAR-5.

I. ETUDE DES MODIFICATIONS DES GLYCANNES DES N-GLYCOSYLPROTEINES
MEMBRANAIRES LIEES A LA TRANSFORMATION MALIGNNE DE CELLULES URO-EPITHE-
LIALES HUMAINES.

A - Introduction

Les premières études comparatives des structures des glycopeptides isolés de glycoprotéines de cellules normales et transformées sont dues à l'équipe de Warren (Buck *et al.*, 1970 ; Buck *et al.*, 1971). La méthodologie employée était la suivante :

1. Marquage métabolique des cellules en culture à l'aide de monosaccharides radioactifs (essentiellement le fucose, la glucosamine ou le mannose).
2. Hydrolyse pronasique des glycopeptides membranaires.
3. Analyse par co-chromatographie de tamisage moléculaire des glycopeptides marqués.

Sur la base de la spécificité des lectines, Debray *et al.* (1983) ont mis au point un schéma général de fractionnement des glycopeptides des N-glycosylprotéines membranaires par chromatographie d'affinité sur ConA et sur LCA (Fig. 14, p. 45).

Nous avons appliqué ce procédé général de fractionnement à 7 lignées de cellules uro-épithéliales humaines possédant des degrés de transformation différents, établies en culture à partir de tissus sains ou cancéreux par le professeur J. Kitler de l'Institut Fibiger de Copenhague (Danemark) et dont les caractéristiques biologiques étaient parfaitement définies.

Le mémoire suivant rapporte l'essentiel des résultats que nous avons obtenus. Il a été publié en 1986 dans "International Journal of Cancer".

CELLULES NORMALES RADIO-MARQUEES PAR UN ^3H MONOSACCHARIDE

CELLULES TRANSFORMEES RADIO-MARQUEES PAR UN ^{14}C MONOSACCHARIDE

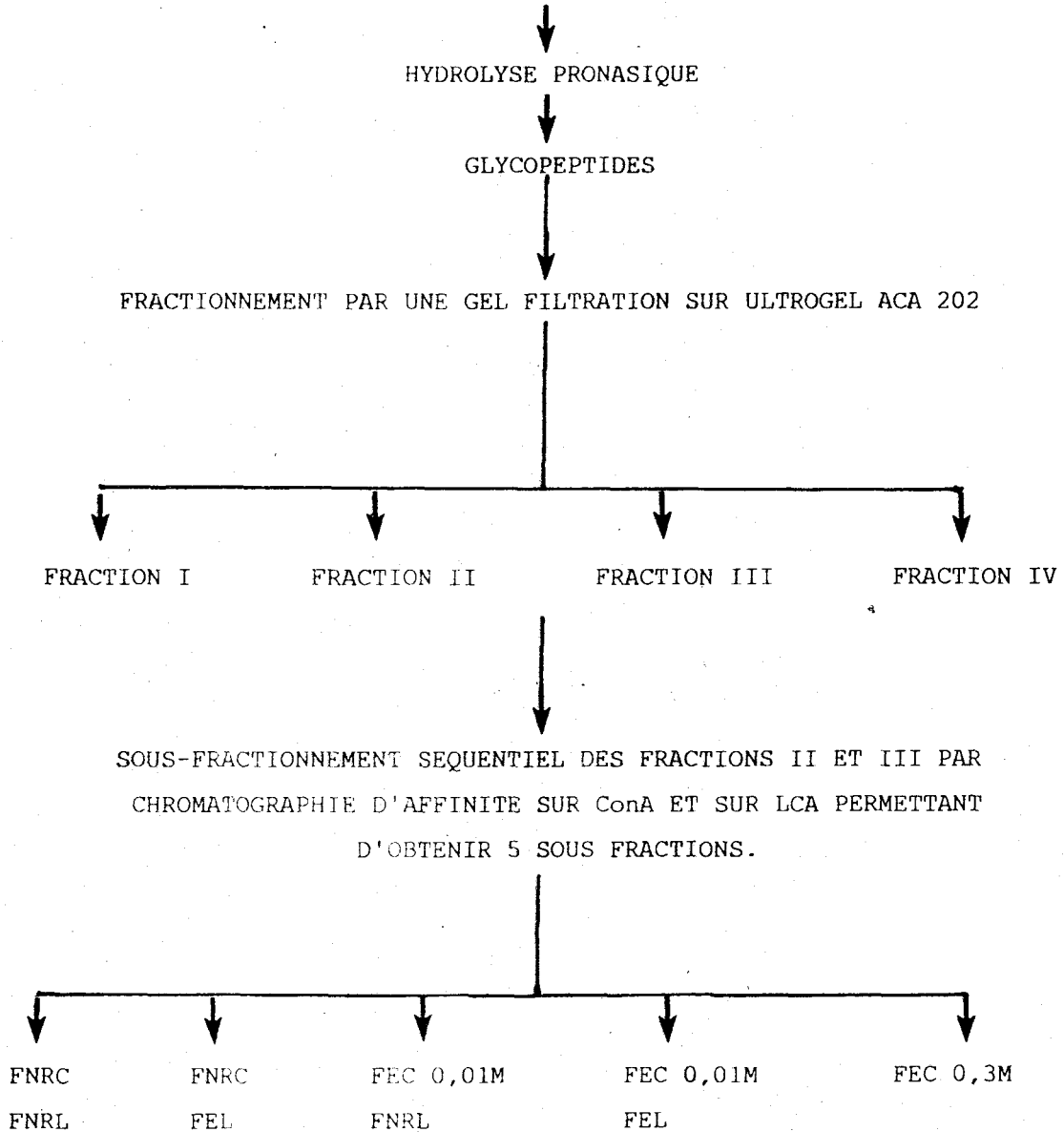


Figure 14. Schéma de fractionnement des glycopeptides cellulaires par chromatographie de tamisage moléculaire sur AcA 202 et par chromatographie d'affinité sur ConA et LCA (Debray et al., 1983).

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 MONTRÉUIL¹, Danuta DUŚ³, Czesław RADZIKOWSKI³, Britta CHRISTENSEN⁴ and Jørgen KIELER⁴

¹Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Associée 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 (Bubenik *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 METHODS⁴

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.

⁴To whom reprint requests should be sent.

⁵On leave of absence

Received September 30, 1985

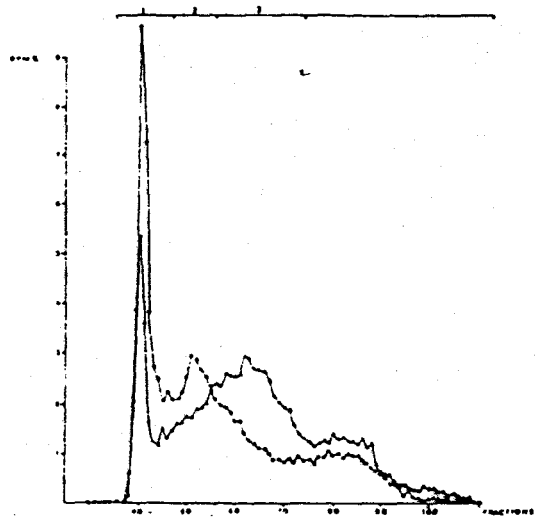


FIGURE 1 - Elution profiles of total cellular glycopeptides fractionated on Ultrogel ACA 202 from: Δ, ³H GlcNH₂-labelled Hu 1734 cells and ●, ¹⁴C GlcNH₂-labelled Hu 549 cells.

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	4
HCV-29	23.7	21.7		16.6
Hu 1734	15.5	19.4	20.5	17.7
Hu 609	30.7	25.75		22.5
HCV-29T	33.0	29.1		14.5
Hu 609T	31.9	25.9	26.7	23.0
Hu 456	27.45	26.2		21.5
Hu 549	30.8	26.35		16.25

¹Fraction 1, protoglycans 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

INSERM (Contract CRE No. 823-029), the MIR (Grant 10.5), the Neye Foundation, and the Boell Foundation, the Polish Academy of Sciences (Contract 82-1009).

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).
- DERRAY, 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. Bög-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., DERRAY, H., MONTREUIL, J., CHRISTENSEN, B., and KIELER, J., Lectin binding to normal, transformed and malignant human uroepithelial cells *in vitro*. In: T.C. Bög-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., DERRAY, H., DEBEIRE, P., and DELANNOY, P., Lectins as oligosaccharide receptors. In: H. Pepper, W. Reutter, F. Gudat, and E. Köngen (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.W., 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 urothelium 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).

C - Conclusion

Les résultats obtenus démontrent clairement que les glycoprotéines membranaires des 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 (1984), sont également enrichies en glycanes de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés avec une diminution simultanée du taux de glycanes biantennés, par rapport aux 2 autres lignées cellulaires HCV-29, et HU1734, non-tumorigènes et non-invasives (degré II de transformation).

Cette observation illustre bien le fait que l'augmentation du nombre des antennes des glycanes de type N-acétyllactosaminique représente un marqueur précoce de la transformation maligne des cellules.

II. MISE EN EVIDENCE DES MODIFICATIONS DE LA N-GLYCOSYLATION DES GLYCO-
PROTEINES MEMBRANAIRES DES CELLULES DU CARCINOME PULMONAIRE DE LEWIS, A
HAUT ET A FAIBLE POUVOIR METASTATIQUE, PAR UTILISATION DE LECTINES
RADIO-MARQUEES.

A - Introduction

Le pouvoir métastatique de cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis (cellule LL₂) et les variants résistants à l'action toxique de certaines lectines sont bien définis par Debray et al. (1989).

Les lignées cellulaires LL₂5, LL₂8 et LL₂30 résistants à l'action toxique de la lectine de germe de blé, possèdent des pouvoirs métastatiques naturels (déterminés par injection sous-cutanée chez la Souris) ou expérimentaux (déterminés par injection intraveineuse) plus faibles que ceux des cellules de la lignée mère.

Le variant cellulaire résistant à l'action toxique de la lectine de ricin (RCAII) présente également les pouvoirs métastatiques naturels et expérimentaux 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* (AAA) a également été sélectionné. Ces cellules présentent un pouvoir métastatique expérimental 10 fois supérieur à celui des cellules de la lignée mère.

Les études de la glycosylation des N-glycosylprotéines des cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis et de ses variants résistants ont montré qu'aux pouvoirs métastatiques différent s'associaient des différences significatives au niveau de l'expression des N-glycopeptides membranaires (Debray et al., 1989).

Les spécificités de certaines lectines vis-à-vis des mono- et oligosaccharides sont parfaitement connues (voir la revue de Sharon, 1988). Afin de visualiser les modifications de la glycosylation des glycoprotéines membranaires de ces différents variants cellulaires, nous avons incubé ces glycoprotéines, préalablement séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et transfert sur nitrocellulose, en présence de lectines marquées par l'¹²⁵I. Nous avons utilisé les lectines suivantes:

1. La lectine de germe de blé (WGA) est capable de reconnaître sélectivement les résidus d'acide neuraminique ou de N-acétylglucosamine ainsi que certains glycopeptides ou oligosaccharides possédant un grand

nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique ou de N-acétylglucosamine (Bhavanandan *et al.*, 1980; Monsigny *et al.*, 198).

2. La lectine de lentille (LCA) est capable de reconnaître des N-glycosylpeptides et fucosylés en α -1,6 sur le résidu de N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice, biantennés et triantennés, à condition que la troisième antenne substituée en β -1,6 le résidu d' α -mannose lie en α -1,6 au noyau pentasaccharidique (Debray *et al.*, 1981).

3. La lectine de la *sambucus nigra-L* (SNA), capable de reconnaître des résidus de galactose et une séquence de Neu5Ac(α -2,6)Gal/GalNAc (Shibuva *et al.*, 1987).

B - Résultats

Après séparation par SDS-PAGE en gradient 5-25 %, les protéines membranaires sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose comme nous l'avons précédemment décrit (voir Matériels et Méthodes p. 42). Les glycoprotéines membranaires ont été caractérisée par détermination de leur masses moléculaires. Les bandes majeures visualisées par autoradiographie sont représentées dans les figures 15 à 19 (p. 56 à 58) et nos résultats sont résumés dans les tableaux V à VIII (p. 59 et 60).



Figure 15. Mise en évidence des glycoprotéines des membranes de cellules de Lewis par l'¹²⁵I-WGA.

Les protéines membranaires de cellules de Lewis sont solubilisées dans le PBS contenant 1 % de Triton X-100, séparées par SDS-PAGE gradient (5-25), électrotransférées sur feuille de nitrocellulose, puis incubées en présence de ¹²⁵I-WGA (6×10^5 cpm/ml). Après lavages, les glycoprotéines reconnues par les lectines sont révélées par autoradiographie. Les masses moléculaires des glycoprotéines ont été estimées par rapport à un mélange témoin de protéines préalablement marquées par ¹²⁵I: phosphorylase b (94.000); albumine (67.000); ovalbumine (43.000); anhydrase carbonique (30.000) et inhibiteur trypsique (20.100).

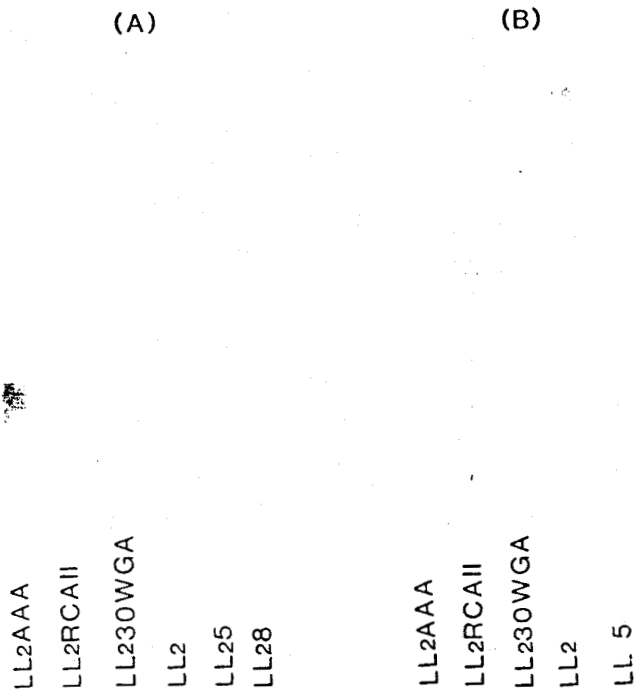


Figure 16. Mise en évidence des glycoprotéines des membranes de cellules de Lewis par l'¹²⁵I-WGA:

(A) : après traitement par la neuraminidase (10 mU/ml dans un tampon citrate de Na 0,1 M pH 5,2 pendant 1h à 37°C).

(B) : en présence de 0,1 M GlcNAc.

Les conditions d'incubations sont décrites Fig. 15 (p. 56).

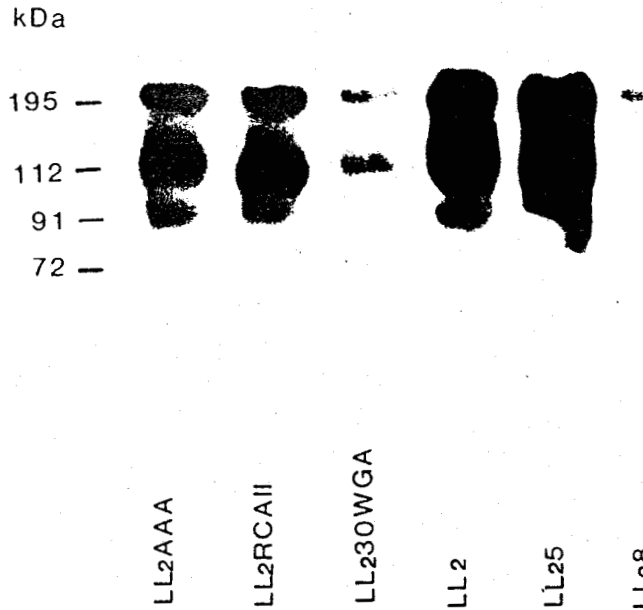


Figure 17. Mise en évidence des glycoprotéines des membranes de cellules de Lewis par l'¹²⁵I-SNA.

Les conditions d'incubations sont décrites Fig. 15 (p. 56).

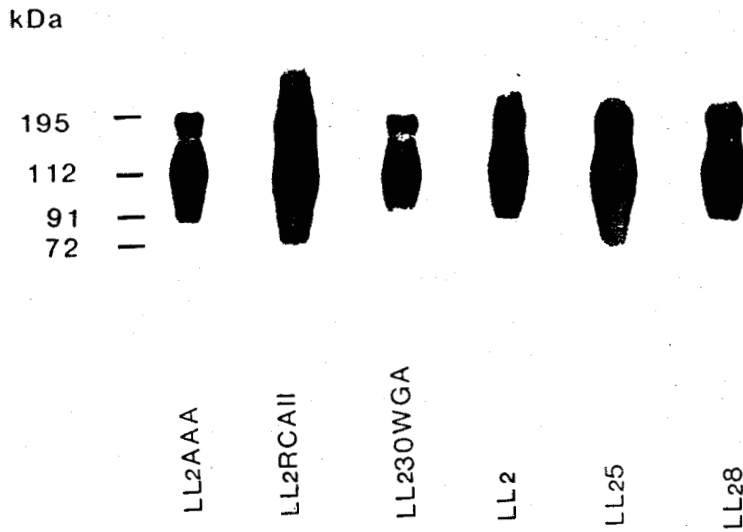


Figure 18. Mise en évidence des glycoprotéines de membranes de cellules de Lewis par l'¹²⁵I-SNA après traitement par la neuraminidase (10mU/ml dans un tampon citrate de Na 0,1 pH 5,2 pendant 1h à 37°C). Les conditions sont décrites Fig. 15 (p. 56)

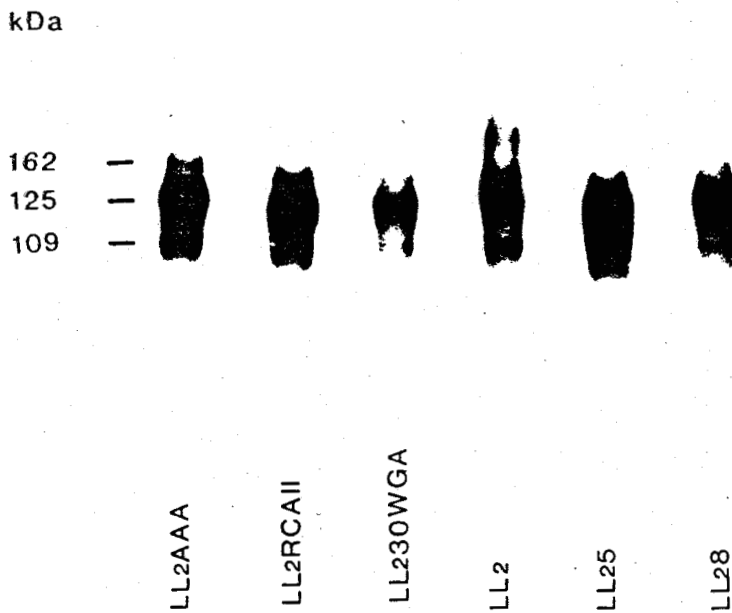


Figure 19. Mise en évidence des protéines glycosylées de membranes de cellules de Lewis par l'¹²⁵I-LCA. Les conditions sont décrites Fig. 15 (p. 56).

TABLEAU V : Identification et masses moléculaires des glycoprotéines membranaires reconnues par ¹²⁵I-WGA dans différentes lignées cellulaires.

Les données de ce tableau réfèrent à la figure 15 (p. 56).

MM (kDa)	LL ₂ AAA	LL ₂ RCAII	LL ₂ WGA	LL ₂	LL ₂ 5	LL ₂ 8
200	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+
87	+	+	+	+	+	+
66	-	-	-	-	+	-

TABLEAU VI : Identification et masses moléculaires des glycoprotéines membranaires reconnues par ¹²⁵I-SNA dans différentes lignées cellulaires.

Les données de ce tableau réfèrent à la figure 17 (p. 57).

MM (kDa)	AAA	RCAII	WGA	LL ₂	LL ₂ 5	LL ₂ 8
195	+	+	+	+	+	+
112	+	+	+	+	+	+
91	+	+	-	+	+	+

C - Discussion et conclusion

La modification de la glycosylation des glycoprotéines membranaires peut être représentative de la transformation. L'étude des cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis et de leurs variants résistants à l'action des lectines par chromatographie sur lectines immobilisées a révélé des différences significatives au niveau de l'expression des N-glycopeptides membranaires (Debray *et al.*, 1989).

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de ces cellules à l'aide de lectines radio-marquées, ne nous ont pas permis d'observer de nettes modifications de la glycosylation des protéines membranaires, hormis dans le cas des variants résistants à l'action toxique de la WGA ainsi que pour la lignée LL₂. En effet, nous avons remarqué une diminution des bandes majeures visualisées après incubation avec l'¹²⁵I-WGA, l'¹²⁵I-SNA et l'¹²⁵I-LCA des glycoprotéines de ces lignées cellulaires à faible pouvoir métastatique par rapport à la lignée mère. Du fait de la spécificité de ces lectines, décrites dans l'introduction de ce chapitre (p. 54) nous pouvons considérer qu'il y a une diminution sensible de la sialylation, en particulier de la liaison Neu5Ac(α-2,6)Gal/GalNAc (Fig. 15 et 17, p. 56 et 57). Nous avons également caractérisé, grâce à la spécificité de l'¹²⁵I-LCA, une diminution des résidus de fucose liés en α-1,6 sur le résidu de N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice des N-glycosylprotéines triantennées (Fig. 19, p. 58). L'addition de GlcNAc 0,1 M ou le traitement par la neuraminidase permet d'inhiber totalement la fixation de l'¹²⁵I-WGA sur les glycoprotéines membranaires. Par contre, l'¹²⁵I-SNA peut se lier aux glycoprotéines après traitement par la neuraminidase, car elle peut aussi reconnaître certains résidus de galactose terminaux.

Les analyses que nous avons réalisés nous ont permis de mettre en évidence des différences quantitatives de la fixation des lectines sur les glycoprotéines des variants cellulaires du carcinome pulmonaire de Lewis, sélectionnés vis à vis de leur pouvoir métastatique. Par contre, en aucun cas, nous n'avons vu disparaître totalement l'une des glycoprotéines chez les variants résistants à l'action des lectines. Finne *et al.* (1980) ont montré la disparition de la glycoprotéine fortement reconnue par la WGA dans des cellules Wa4b1 résistantes à cette lectine et à faible pouvoir métastatique. Cette glycoprotéine majeure est

présente dans les cellules de la lignée mère (mélanome murin B16) à haut pouvoir métastatique. De plus, ces auteurs ont étudié les modifications des glycopeptides membranaires dans les cellules Wa4b1 résistantes à la WGA et ont montré :

1. La diminution de la liaison Neu5Ac(α -2,3)Gal.

2. L'augmentation d'une liaison Fuc(α 1-3)GlcNAc.

En conclusion, ces résultats suggèrent que la modification de la glycosylation des glycoprotéines membranaires est due à des variations de l'activité des glycosyltransférases spécifiques.

III. ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE L'AUGMENTATION DE LA QUANTITE DE
D'ACIDES SIALIQUES ET LE POUVOIR METASTATIQUE DES CELLULES TUMORALES.

A - Introduction.

L'altération des glycoconjugués de surface cellulaire est un phénomène général de la transformation cellulaire (Nicolson, 1982). En particulier, les modifications de la sialylation et du métabolisme de l'acide sialique ont été particulièrement remarquées par certains auteurs (Ohta et al., 1968 ; Grimes, 1970 ; Warren, 1972)

Ces modifications de la sialylation s'accompagnent d'une augmentation des activités des sialyltransférases cellulaires. Parallèlement, plusieurs auteurs ont suggéré qu'il existait une relation directe avec l'hypersialylation des cellules transformées et l'apparition d'une potentialité métastatique (Yogeeswaran et Salk., 1981; Warren, 19xx). En effet, l'acide sialique est impliqué dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Berwick et Coman, 1962 ; Kemp, 1963), la mobilité cellulaire et l'invasion *in vitro* (Ray, 1977), et également dans l'immunogénicité, propriétés pouvant intervenir dans la métastase (Nicolson, 1982).

Suite à notre étude de la glycosylation des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis, nous avons poursuivi notre analyse par le dosage des acides sialiques totaux de cellules possédant des pouvoirs métastatiques différents, afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre la sialylation et le pouvoir métastatique.

Dans notre étude, nous avons utilisé les cellules du carcinome pulmonaire murin de Lewis à haut et à faible pouvoir métastatique, afin de comparer les variations de la sialylation ainsi que la composition en monosaccharides de ces différentes lignées cellulaires.

B - Dosage de l'acide sialique des membranes cellulaires.

Nous avons utilisé la technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC) mise au point par Powell et Hart (1982) pour doser l'acide sialique avec une sensibilité de l'ordre de la picomole. L'acide sialique libéré des membranes par hydrolyse par HCl 0,1 N à 80°C pendant une heure, selon la méthode préconisée par Warren (1959), traité par le périodate de sodium et le réactif d'acide thiobarbiturique (TBA), est ensuite chromatographié sur une colonne C₁₈ en phase reverse (Bio-Rad). Le profil chromatographique obtenu par mesure de l'absorbance à 549 nm est présenté à la figure 20 (p. 66). Le pic I (temps de rétention : 9,6

min) et le pic III (temps de rétention : 18,5 min) correspondent respectivement à l'acide sialique et au 2-desoxyglucose. Par rapport à la technique de Warren, cette chromatographie permet d'obtenir une bonne résolution des deux chromophores. Le périodate convertit l'acide sialique en acide β -formyl-pyruvique et le desoxyglucose en malonaldéhyde. Le chromogène du malonaldéhyde possède un groupe carboxyle de moins, ce qui est responsable de l'augmentation du temps de rétention en phase réverse. Les chromophores du Neu5Ac et du Neu5Gc co-migrent dans ce système (Powell et Hart, 1982).

Afin de calculer la quantité d'acide sialique, nous avons préalablement établi une courbe étalon en utilisant des concentrations croissantes d'acide sialique variant de 100 à 7000 pmol. Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 21 (p. 67). Nous avons ensuite dosé l'acide sialique des différentes lignées cellulaires. La teneur en acide sialique des glycoprotéines et des glycolipides a également été déterminée. (Tableau IX, p. 68).

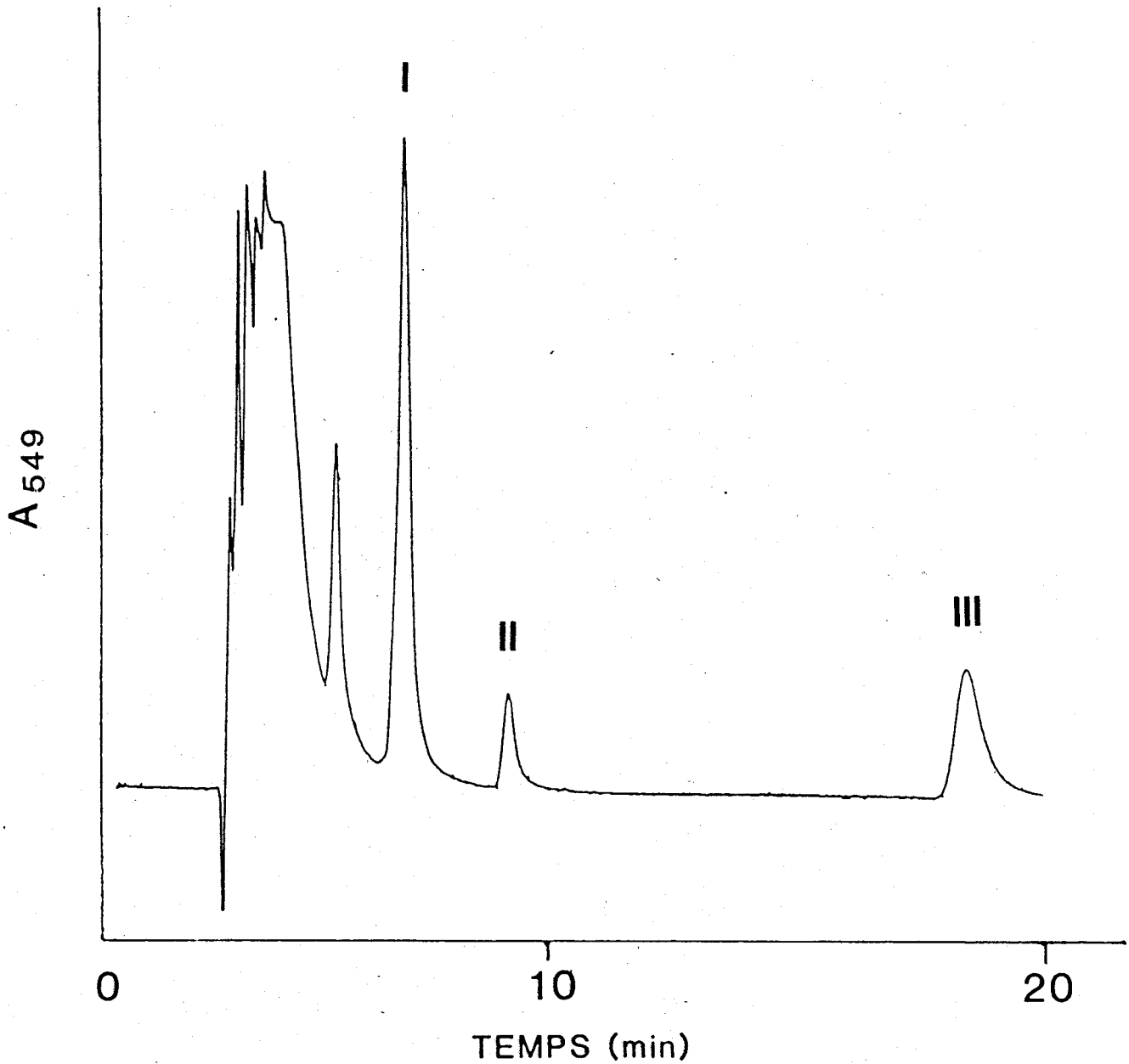


Figure 20. Analyse en HPLC des chromophores thiobarbituriques. L'acide sialique libéré par hydrolyse ménagée, est traité par le périodate de sodium et le réactif thiobarbiturique et les chromophores sont analysés sur une colonne C₁₈ en phase réverse et détectés à 549 nm. Les pics I et III représentent respectivement le Neu5Ac et le 2-désoxyribose.

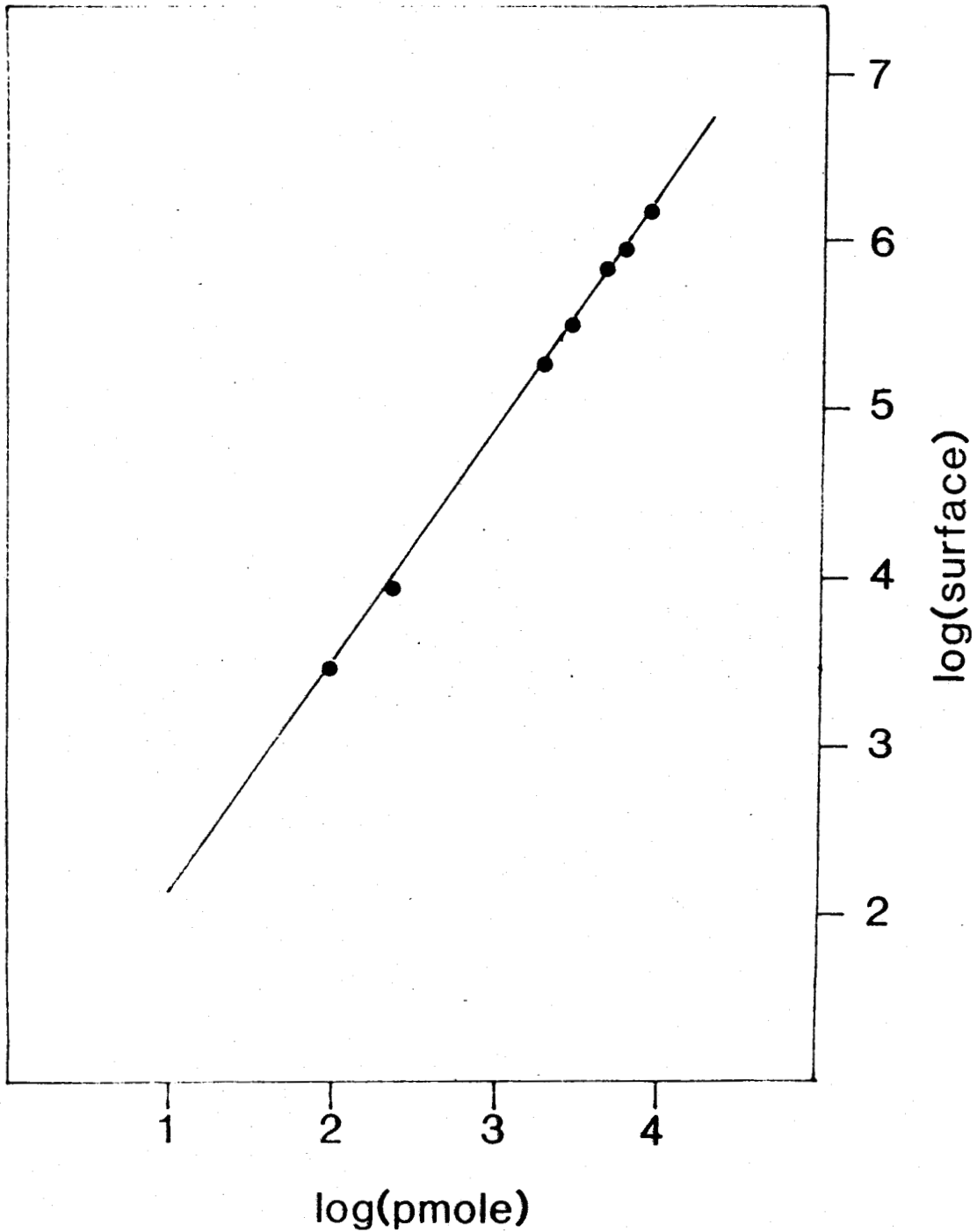
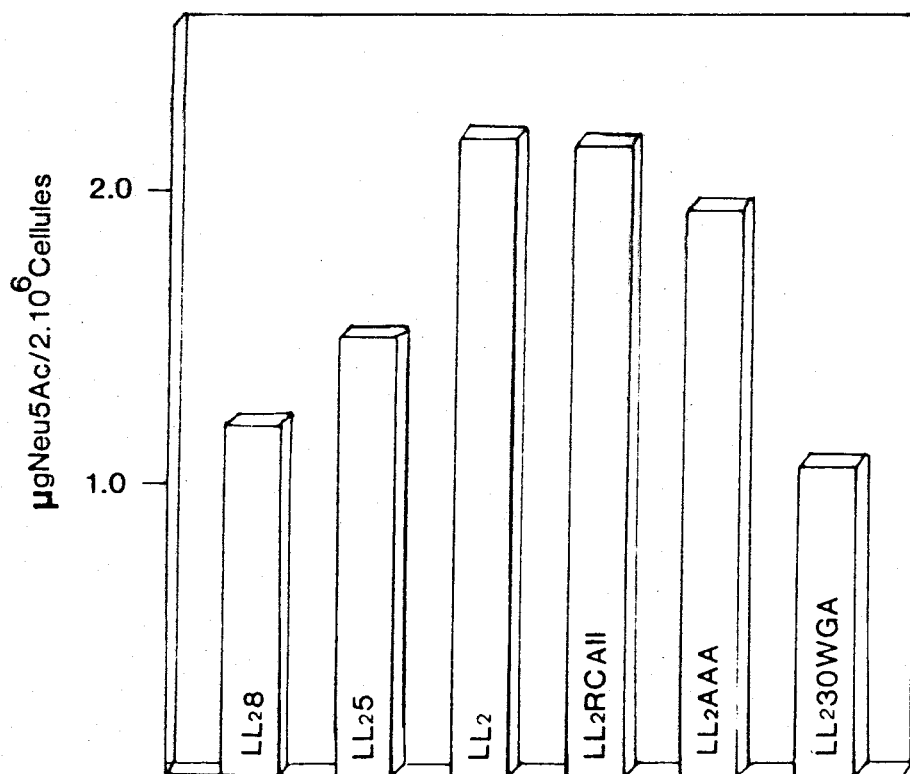


Figure 21. Gamme étalon du dosage au réactif thiobarbiturique. La concentrations en Neu5Ac a été déterminée pour des quantités variant de 100 à 7000 pmol. L'intégration électronique est effectuée par le module de Spectra-Physics SP-4290.

TABLEAU IX : Quantités d'acides sialiques libérés de 2.10^6 cellules de carcinome pulmonaire de Lewis (Neu5Ac T), liés aux glycoprotéines (Neu5Ac GP) et aux glycolipides (Neu5Ac GLP).

Lignées cellulaires	Neu5Ac ($\mu\text{g}/2 \cdot 10^6 \text{ c}$)		
	Neu5AcT	Neu5AcGP	Neu5AcPLP
LL ₂	2,19	1,38	0,62
LL ₂ 5	1,50	1,09	0,10
LL ₂ 8	1,23	1,13	0,55
LL ₃₀ WGA	1,09	0,80	0,16
LL ₂ RCA _{II}	2,18	1,10	0,80
LL ₂ AAA	1,95	0,97	0,70



Lignées cellulaires

Représentation schématique de la quantité d'acide sialique des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis et de ses variants.

C - Détermination de la composition en monosaccharides des cellules du
carcinome pulmonaire de Lewis.

Lors de la sélection des mutants résistants à l'action des lectines, la composition en monosaccharides des lignées cellulaires obtenues est généralement modifiée (Finne et al., 1980). Nous avons donc voulu vérifier si nous pouvions faire la même observation dans le cas de cellules de Lewis (LL₂). La composition en sucres a été déterminée selon la méthode de Zanetta et al. (1972). Les sucres libérés des cellules par méthanolyse sont analysés par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés (Fig 22, p. 70). Les teneurs en monosaccharides sont indiquées dans le tableau X (p. 70). Nous pouvons remarquer une variation de la composition en sucre entre les différentes cellules métastatiques. Les quantités de GlcNAc et de Gal sont plus élevées dans les cellules LL₂ à haut pouvoir métastatique et dans les cellules résistantes à l'action toxique de la l'AAA.

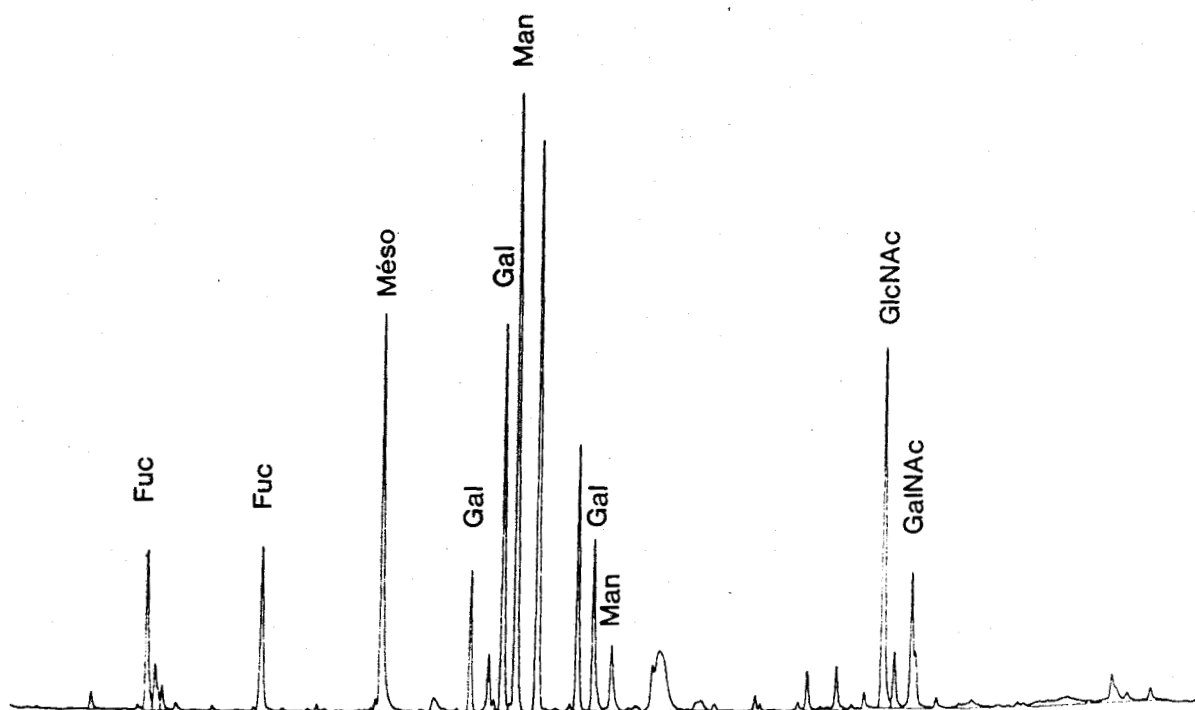


Figure 22. Détermination de la quantité des sucres de carcinome pulmonaire de Lewis par CPG par rapport au témoin interne.

TABLEAU X : Teneurs en monosaccharides des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis à haut et à faible pouvoir métastatique obtenus par dosage au CPG et exprimés en μg de sucre/ 2×10^6 cellules.

Lignées cellulaires	Neu5Ac*	Fuc	Man	Gal	GlcNAc	GalNAc
LL ₂	2,19	0,20	2,00	3,00	3,10	1,00
LL ₂ 5	1,50	0,36	1,43	1,70	1,88	0,36
LL ₂ 8	1,23	0,43	1,90	1,80	2,10	0,50
LL ₂ 30WGA	1,09	0,14	1,70	2,40	2,00	0,59
LL ₂ RCA _{II}	2,18	0,52	2,80	1,80	1,20	0,86
LL ₂ AAA	1,95	/	1,19	1,36	1,00	0,33

* Les quantités de Neu5Ac ont été déterminés par la méthode de Powell et Hart (1986).

D - Discussion et conclusion.

D'après les travaux de Yogeeswaran et Salk (1981), la quantité élevée d'acide sialique et le degré de sialylation des résidus de galactose et de N-acétylglucosamine des glycoconjugués membranaires sont en relation directe avec le pouvoir métastatique des cellules transformées. Parallèlement, les variants de cellules CHO (Birles, 1982) et de cellules tumorales MDW40 sélectionnées par l'action toxique de la WGA présentent un taux d'acide sialique moins élevé que les cellules parentales et lorsque l'on réduit la malignité cellulaire (Stanly et al., 1980 ; Yogeeswaran et Tao, 1980 ; Dennis et al., 1982) la teneur en acide sialique diminue également. La sélection des mutants de cellules tumorales MDAY-D2, de cellules de mélanome B16 ou PG19 sous l'action toxique de la WGA montre la disparition du pouvoir métastatique ou la réduction de la malignité (Brawell et Harris, 1978 ; Tao et Burger, 1977 ; Dennis et al., 1981 ; Dennis et Kerbel, 1981). Par contre, les mutants résistants à l'action de la lectine de ricin RCA_I , de la leuco-agglutinine (PHA_L) et de la ConA présentent un pouvoir métastatique, ou avaient une augmentation du pouvoir métastatique équivalent voire plus élevé que celui des lignées parentales, (Reading et al., 1980 ; Tao et Burger, 1982).

Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre la quantité d'acide sialique et le pouvoir métastatique de cellules du carcinome pulmonaire de Lewis (LL_2) et des variants résistants à l'action de lectines. (Figure, P. 68).

1. Les variants résistants à la WGA présentent la plus faible quantité d'acide sialique qui diminue en même temps que la réduction du pouvoir métastatique cellulaire.

2. Les variants résistants à la RCAII, spécifique des résidus de galactose ou de N-acétylgalactosamine, présentant une réduction de leur pouvoir métastatique, montrent également une diminution de l'acide sialique par rapport aux cellules parentales.

3. Nous n'avons pas observé de variation de la concentration en fucose par rapport à l'acide sialique. Ce résultat montre que le fucose ne semble être en relation avec le pouvoir métastatique.

4. Nous avons observé le taux élevé de galactose et de N-acétylglucosamine dans les cellules LL₂ et LL₂AAA à haut pouvoir métastatique. Par contre, les variants résistants à la WGA, à la RCAII et les lignées LL₂5 et LL₂8 à faible pouvoir métastatique montrent une diminution de galactose et de N-acétylglucosamine par rapport à celui des cellules parentales à haut pouvoir métastatique.

En conclusion, nos résultats sont en accord avec ceux de Finne *et al.* qui ont montré que la simplification du type N-acétyllactosaminique et la diminution de la sialylation des variants cellulaires du mélanome B16 résistants à la WGA conduisait à une réduction de la tumorigénicité et du pouvoir métastatique.

IV. ETUDE DES MODIFICATIONS DU RAPPORT Neu5Ac / Neu5Gc DANS LES CELLULES TRANSFORMEES PAR L'ONCOGENE c-Ha-ras.

A - Introduction

Parmi les 23 dérivés de l'acide neuraminique provenant de la substitution des groupements $-NH_2$ et $-OH$, seuls les acides N-acétylneuraminique et N-glycolylneuraminique sont considérés comme des formes essentielles.

Le rôle biologique du Neu5Ac et du Neu5Gc ne semble pas équivalents (Sherblom et Dahlin, 1985). Le Neu5Gc apparaît généralement comme un antigène des glycolipides membranaires. Les variations de la quantité relative de Neu5Ac et de Neu5Gc a été associée à la différenciation des cellules de l'intestin de Rat (Bourbour et Bourbour, 1983). Le Neu5Gc est aussi lié sur une O-glycosylprotéine de l'adénocarcinome 13762 de Rat.

L'emploi de fibroblastes de rein de Hamster normaux et transformés soit par le virus oncogène du sarcome du Hamster (BHK21/C13-HSv) soit par l'oncogène humain C-Ha-ras (BHKras), nous avons mis au point une méthode simple d'étude des modifications des acides sialiques des cellules transformées.

Après avoir déterminé les conditions optimales d'hydrolyse du Neu5Ac et du Neu5Gc, nous avons mis au point une méthode simple d'étude des modifications des acides sialiques cellulaires en déterminant la proportion de ces 2 dérivés dans des fibroblastes de rein de Hamster transformés par le sarcome du Hamster (BHK21/C13-HSv).

Nous avons ensuite entrepris l'analyse des acides sialiques de cellules normales et transformées par transfection d'un oncogène. Notre choix s'est porté sur le fibroblastes murins NIH 3T3 (Jainchill et al., 1969), transformés par l'oncogène humain c-Ha-ras EJ. La famille de l'oncogène ras est une famille spécifique *in vivo* des protéines G, protéines capables de fixer le GTP et présentant une activité GTPase, à localisation membranaire. Les protéines p21ras traduites de ce gène (De Vos et al., 1988 ; Jurnak, 1988) sont retrouvées dans les tissus humains normaux (Furth et al., 1987). Ces protéines, micro-injectées dans la cellule, provoquent la transformation tumorale (Stacey et Kung, 1984) et une augmentation du pH intracellulaire (Hagag et al., 1987). Elles induisent l'expression de l'oncogène c-fos (Stacey et al., 1987), lui-même responsable de l'augmentation des potentialités métastatiques. Taniguchi et al. (1986) ont également proposé le rôle du gène ras dans la métastase.

Les effets du gène ras sur les cellules NIH 3T3 ont déjà été étudiés (Chambers et Tuck, 1988) et sont résumés dans le tableau IV (p. 35).

L'essentiel des résultats obtenus sur les cellules NIH 3T3 transfectées font l'objet d'un mémoire soumis pour publication dans la revue "Science".

B - Détermination des conditions optimales d'hydrolyse du Neu5Ac et du Neu5Gc sur la lactotransferrine bovine et le fibrinogène bovin.

La composition en sucres de la lactotransferrine bovine (LTF) et du fibrogène bovin a été déterminé par Spik et al. (1988), et Debeire et al. (1985). Afin d'améliorer les conditions d'hydrolyse du Neu5Ac et du Neu5Gc, nous avons méthanolysé la LTF par l'HCl 0,05 N ou 0,1 N en solution dans du méthanol anhydre pendant des temps variant de 30 min à 5 h à la température de 80°C. Les dérivés triméthylsilylés du Neu5Ac sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse. La quantité maximale de Neu5Ac est libérée après 1 h (Fig. 23, p. 77) par l'HCl 0,1 N et après 2 h (Fig. 25, p. 78) en présence d'HCl 0,05 N. Par méthanolyse par HCl 0,05 N, on obtient une libération de 75 % du Neu5Ac (Fig. 24, p. 77). Si une réacétylation est effectuée après la méthanolyse (Fig. 26, p. 78), le taux maximal de Neu5Ac peut atteindre 95 % de la quantité totale du Neu5Ac estimée par la méthode de Warren.

La libération quantitative du Neu5Gc du fibrogène bovin (contenant environ 40 % de Neu5Gc) peut être obtenue par 1 h de méthanolyse par HCl 0.1N ou par trois heures de méthanolyse par HCl 0.05N (Fig. 27, p. 79). De plus nous avons remarqué que le Neu5Gc est stable en présence d'HCl 0.1N.

C - Identification du Neu5Ac et du Neu5Gc des cellules BHK21/13-HSv.

Sur la base des conditions optimales d'hydrolyse préalablement déterminées, nous avons effectué une méthylation du Neu5Ac et du Neu5Gc des cellules BHK21/C13-HSv libérés après méthanolyse par l'HCl 0,1 N dans le méthanol anhydre à 80 °C pendant une heure. Après réacétylation, les dérivés perméthylés du Neu5Ac et du Neu5Gc sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Fig. 28, p. 80). Les pics I et II

correspondent respectivement à l'acide N-acétylneuraminique et à l'acide N-glycolylneuraminique en mélange équimolaire (Fig. 28-A, p. 80). La réponse molaire du Neu5Gc est égale à 0,48 par rapport à la même quantité du Neu5Ac. La méthanolyse des cellules BHK21/C13-HSv nous a permis de caractériser les dérivés perméthylés du Neu5Ac et du Neu5Gc (Fig. 28-B, p. 80). L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par impact électronique (EI-MS) (Fig. 3 du mémoire, p. 88) et par ionisation chimique (CI-MS) (Fig. 29-A et B, p. 81), nous a permis d'analyser les fragments et de les assigner à l'acide N-acétylneuraminique grâce aux ions caractéristiques ; m/z 129, 274, 315, 345, et 376 et à l'acide N-glycolylneuraminique ; m/z 159, 304, 348, 378, 392 et 406. Les ions 408 et 438 correspondent au $M+1$ de la masse de l'acide N-acétylneuraminique perméthylé et de l'acide N-glycolylneuraminique perméthylé obtenu par l'analyse de CI-MS. (Fig. 29-A et B, p. 81).

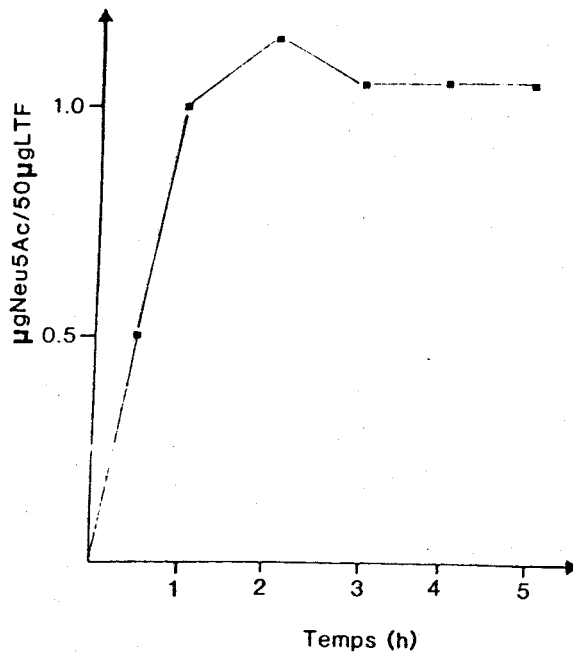


Figure 23. Cinétique de méthanolyse des acides sialiques par l'acide chlorhydrique 0.05N dans le méthanol anhydre.

50 µg de LTF sont méthanolysés à 80°C pendant des temps différents. Le dérivé triméthylsilylés du Neu5Ac est analysé par CPG et la quantité de Neu5Ac est déterminée par rapport au témoin interne.

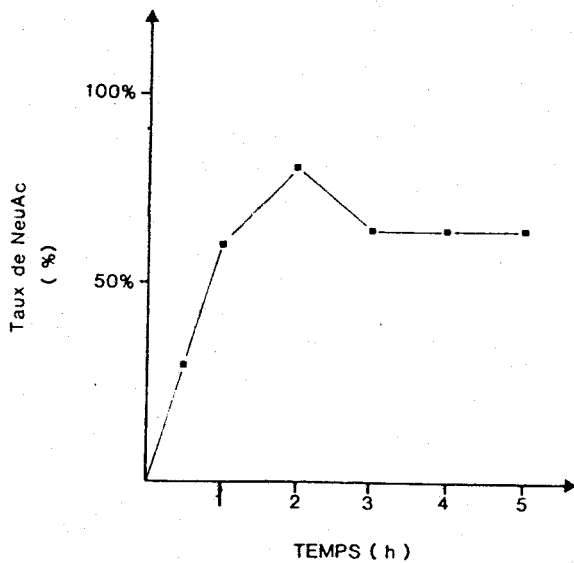


Figure 24. Pourcentage d'acide sialique libéré (HCl 0,05N) en fonction du temps de méthanolyse.

Le taux de Neu5Ac obtenu après méthanolyse est exprimé en pourcentage du Neu5Ac total déterminé par la méthode de Warren.

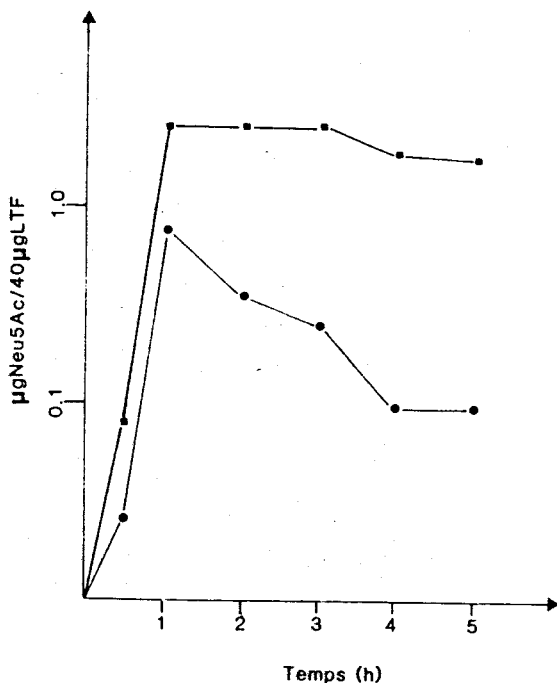


Figure 25. Cinétique de méthanolyse des acides sialiques par HCl 0.1N dans le méthanol anhydre, la quantité d'acide sialique étant déterminée avant (-•-) ou après (•---•) N-réacétylation.

40 µg de LTF bovine sont méthanolysés à 80°C pendant des temps différents. La réacétylation (-■-) est effectuée après méthanolyse. Les dérivés triméthylsilylés du Neu5Ac sont analysés par CPG et la quantité de Neu5Ac est déterminée par rapport au témoin interne.

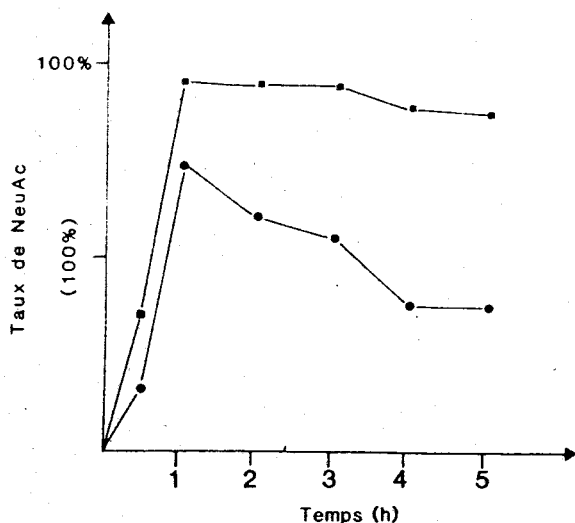


Figure 26. Pourcentage d'acide sialique libéré (HCl 0,1 N) en fonction du temps de méthanolyse.

Le taux de Neu5Ac obtenu après méthanolyse (-•-) ou méthanolyse et réacétylation (•---•) est exprimé en pourcentage du Neu5Ac total déterminé par la méthode de Warren.

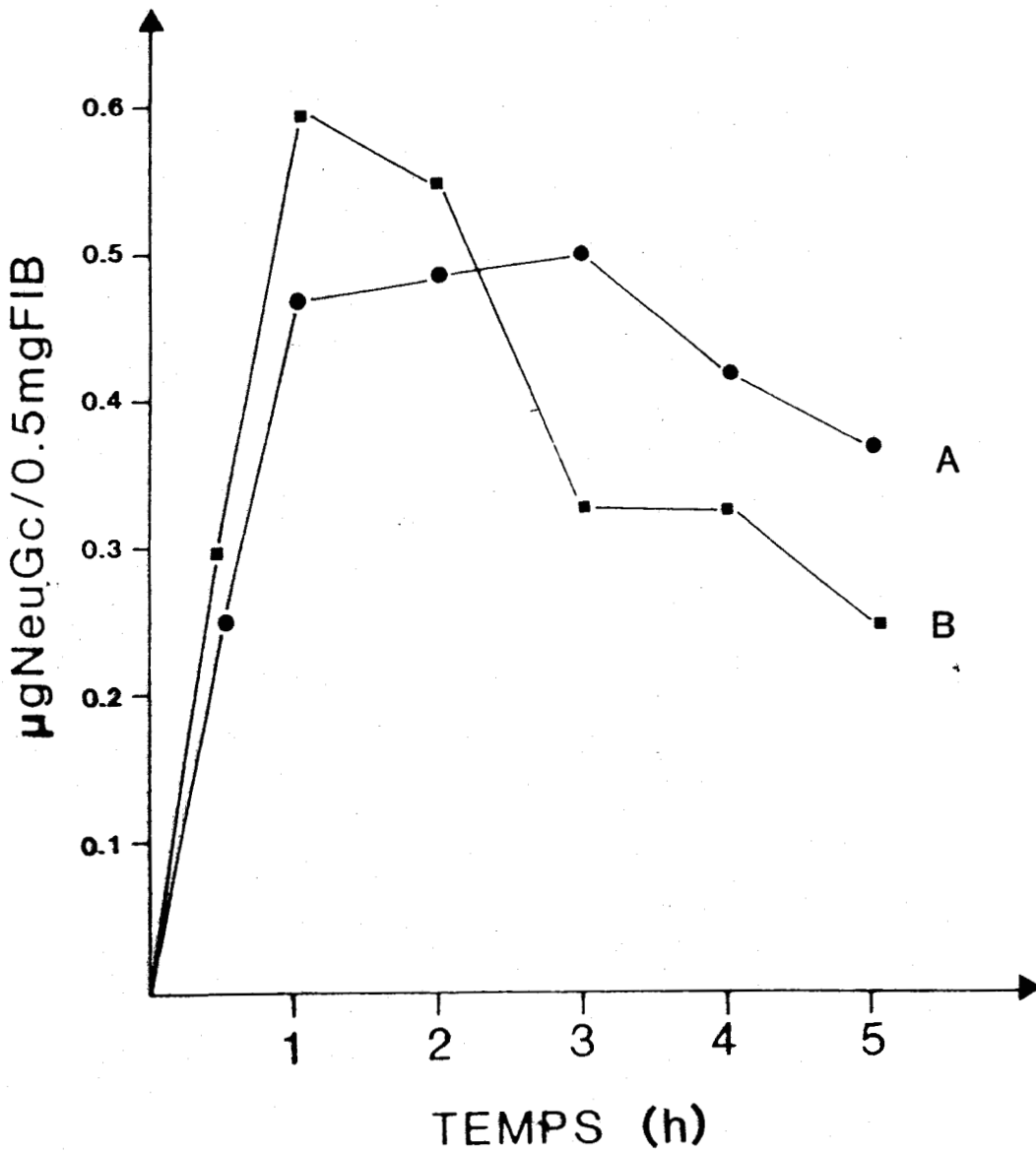


Figure 27. Cinétique de méthanolyse des acides sialiques du fibrinogène bovin par : (A) le méthanol chlorhydrique 0,05 N,
(B) le méthanol chlorhydrique 0,1 N.

500 µg de fibrinogène bovin sont méthanolysés à 80°C dans le méthanol chlorhydrique pendant des temps variables. Les dérivés triméthylsilylés du Neu5Gc sont analysés par CPG et la quantité de Neu5Gc est déterminée par rapport au témoin interne.

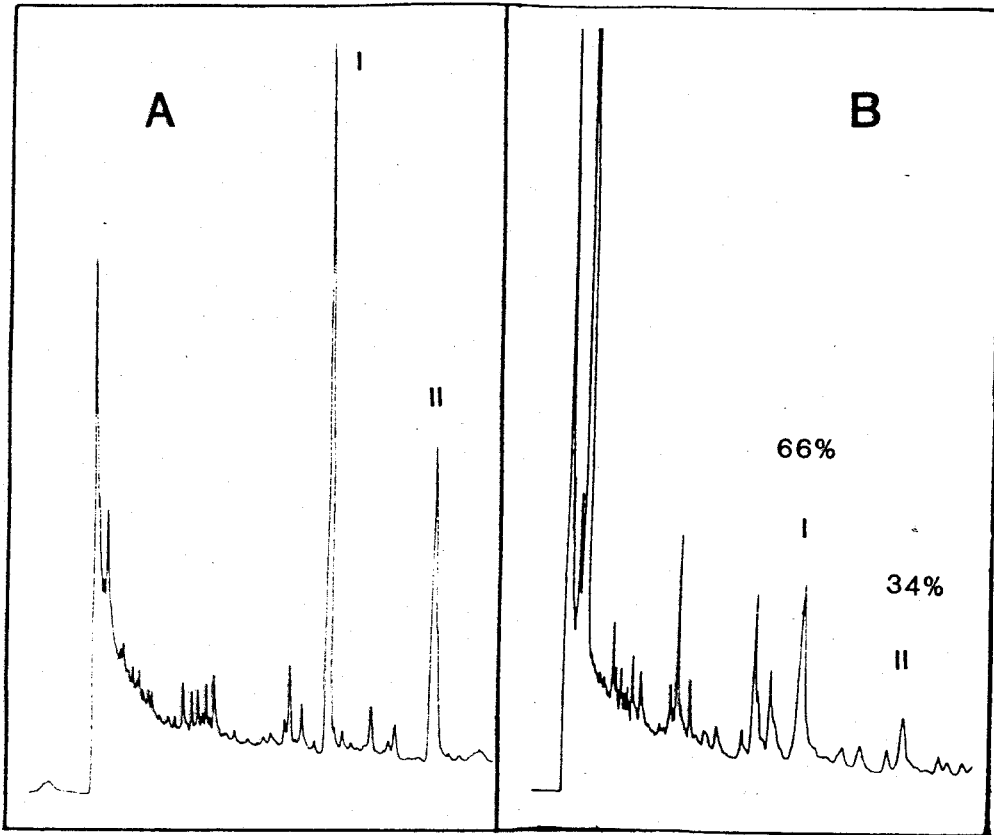


Figure 28. Chromatographie en phase gazeuse des dérivés perméthylés de l'acide N-acétylneuraminique (Pic I) et d'acide N-glycolylneuraminique (Pic II). (A) provenant d'un mélange équimolaire témoin. (B) provenant de cellules BHK21/C13-HSV.

Les pourcentages de Neu5Ac et de Neu5Gc des cellules BHK21/C13-HSV sont indiqués sur le diagramme (B). Ils ont été déterminés par rapport au mélange équimolaire témoin présenté dans le diagramme (A).

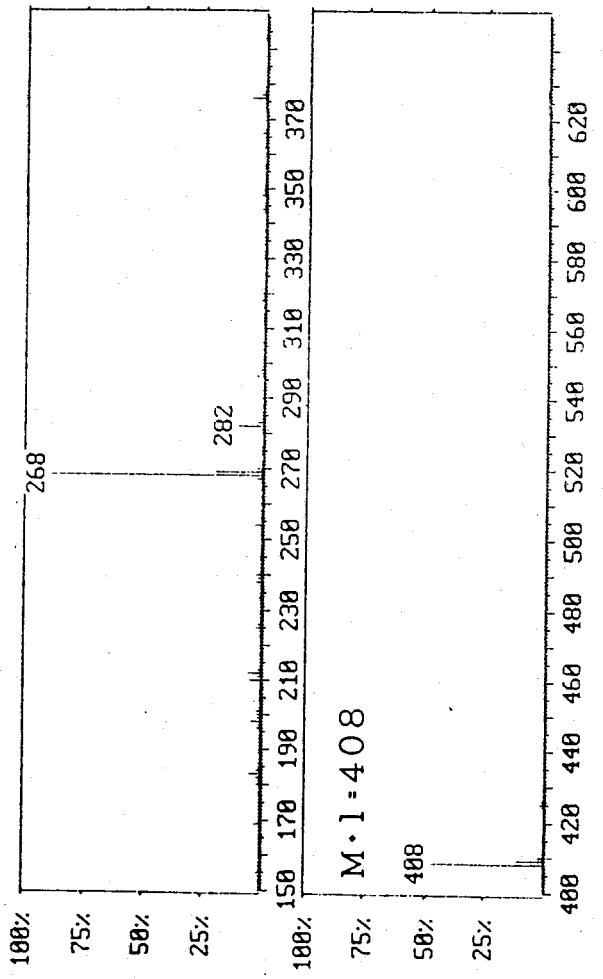
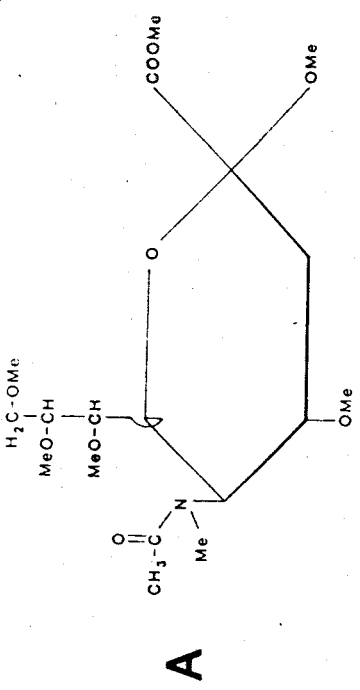
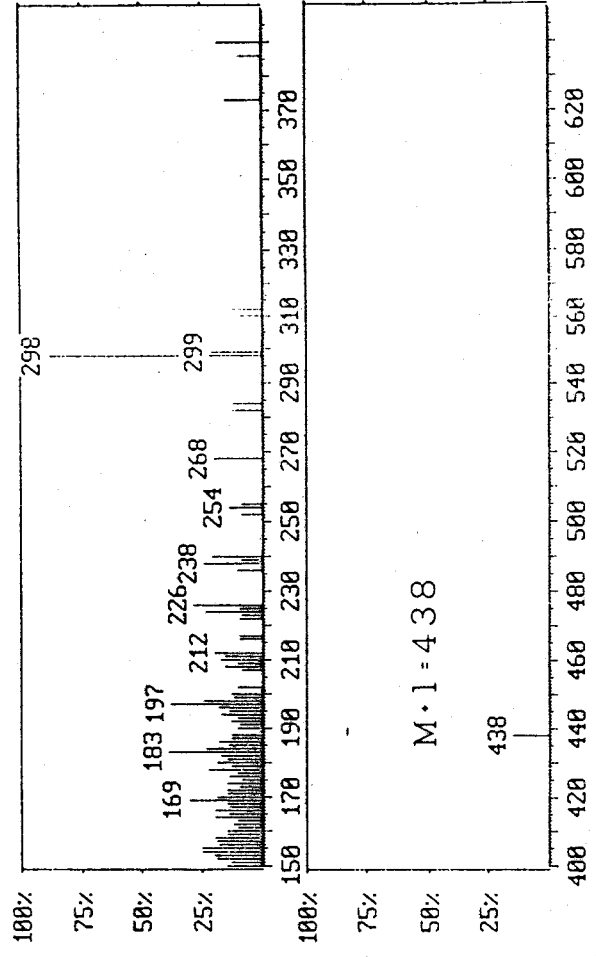
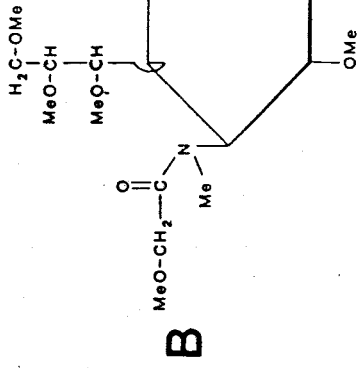


Figure 29. Analyse des fragments caractéristiques des dérivés perméthylés de l'acide N-acétylneuraminique (A) et de l'acide N-glycolylneuraminique (B) obtenu par ionisation chimique.

APPEARANCE OF N-GLYCOLYLNEURAMINIC ACID IN *c-Ha-ras*-TRANSFECTED
MOUSE FIBROBLAST CELL LINES IS ASSOCIATED WITH TRANSFORMATION.

Qin ZHU¹, Vincent LAUDET², Haris CAZLARIS¹, Nadia LE MARER¹, Philippe
DELANNOY^{1*} and Jean MONTREUIL¹.

¹ : Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Tech-
niques de Lille Flandres-Artois, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S.
n°111, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

² : Unité d'Oncologie Moléculaire, Unité I.N.S.E.R.M. n°186 et Unité
Associée au C.N.R.S. n°156, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette,
BP 245, 59019 Lille Cedex, France.

* : to whom correspondance should be addressed.

Key-words : N-glycolylneuraminic acid; *c-Ha-ras* oncogene; gas-liquid
chromatography-mass spectrometry; NIH-3T3 cell.

Abbreviations : Neu5Gc, N-glycolylneuraminic acid; Neu5Ac, N-acetylneu-
raminic acid; g.l.c., gas-liquid chromatography; m.s., mass spectrome-
try; NIH_{neo}, pSV2-*neo*-EJ-transfected NIH-3T3 fibroblasts; NIH_{ras}, *c-Ha*-
ras-transfected NIH-3T3 fibroblasts; NIH_{rasT}, cells isolated from the
primary tumors; NIH_{rasM}, cells isolated from lung metastases.

Summary : Quantitative liberation of cell membrane associated sialic acids by mild acid methanolysis, followed by permethylation and analysis of the permethylated methyl glycoside methyl esters by gas-liquid chromatography coupled to mass spectrometry allowed us to titrate Neu5Ac and Neu5Gc in mouse fibroblasts transfected by the c-Ha-ras oncogene. Neu5Gc, undetectable in control cells, was characterized in transfected cells as well as in cells isolated from primary tumors and from lung metastases. We can therefore associate the presence of Neu5Gc with experimental transformation induced by the introduction of an activated proto-oncogene.

Glycoconjugate sialic acids are involved in numerous cell-cell interactions (1) and cell surface hypersialylation is a common phenomenon of virally or chemically transformed mammalian cells (2). Moreover, sialic acids appear to be correlated with metastatic capacity in a variety of tumor cells (3). Sialic acids exist in two major forms, N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids, which have different chemical and biological properties, including the resistance to the cleavage by some neuraminidases (4). Neu5Gc in particular has been considered as a differentiation marker during the development of the rat intestine (5), but also as a tumor-associated compound appearing on O-linked oligosaccharides of rat 13762 mammary adenocarcinoma cells (6). Neu5Gc is synthesized in the cytosol by direct conversion of CMP-Neu5Ac into CMP-Neu5Gc (7). The hydroxylase responsible for this conversion has been recently described (7) and might be activated during oncogenesis (8,9). Oncogenes as well as cell-surface carbohydrates are implicated in tumorigenesis and malignant progression (for reviews, see refs 2 & 10). In particular, ras-induced cell transformation is known to alter

glycosylation (11,12). Correlations with the metastatic process have been established (13), but no specific ras-induced sugar marker is known to date. In a previous study (Cazlaris et al., 1989, submitted), we reported a global increase of sialyltransferase activity in NIHras cells, directly associated with experimental metastatic capacity. In this paper, we describe the triggering of the appearance of Neu5Gc in metastatic NIHras cells. The results of the present study suggest that Neu5Gc appearance is undoubtedly associated oncogenic transformation of NIH-3T3 fibroblasts since ras-transformed metastizing cells express it, while untransfected non-metastatic reference cells do not.

NIH-3T3 cells were transfected with the pSV2 neo EJ plasmid (14) and selected *in vitro* for resistance to G418. Southern blot analysis of the various cell lines showed that the human c-Ha-ras EJ probe does not cross-hybridize with the endogenous c-ras of NIH-3T3 cells (Fig.1,II) and proved the presence of activated c-Ha-ras EJ in all transformed cell lines, as indicated by the expected 6.6 kb band upon digestion with Bam HI. The analysis of clonality was performed with Kpn I digestion, which cleaves the introduced gene only once (Fig.1,I). This revealed that the original NIHras transfectants, resulting from a pool of colonies, behaved as a single clone. NIHras are metastatic to the lung upon subcutaneous injection into Balb C nu/nu mice. Fragments of primary tumors and of lungs of NIHras-injected mice were established in culture and isolated by G418 selection. Both cell lines contain the transfected ras gene (Fig.1,II). The cell populations from both NIHrasT and NIHrasM were also clonal. The presence of additional bands smaller than 6.6 kb in the Bam HI digests (major bands at 6.0 kb, 4.5 kb and 3.0 kb) suggested that some rearrangements of the oncogene may have occurred in NIHrasT and NIHrasM during the *in vivo* passage. Nevertheless, immuno-precipitation analysis (Fig.2) reveals that ras introduced gene is well expressed as

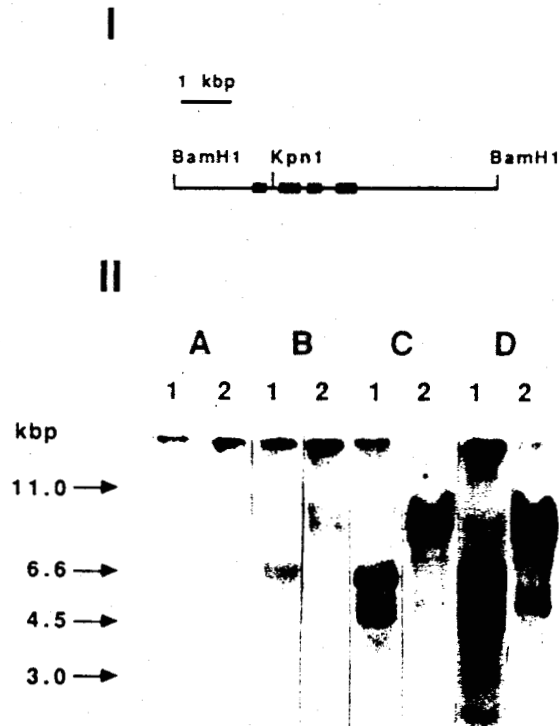


Fig.1 : (I) Genetic map OF THE PSV2 neo EJ plasmid.

Black boxes represent *ras* exons.

(II) Detection of the *c-Ha-ras* EJ gene by Southern blot analysis. Digestions are as follows : lane A, NIH-3T3; lane B, NIHras transfectant; lane C, NIHrasT; lane D, NIHrasM. DNA from 10^7 cells of each line was extracted and DNA analysis performed by restriction endonuclease digestion (14), agarose electrophoresis of the fragments and Southern blot hybridisation with a nick-translated probe obtained by BamH1 digestion of the plasmid pSV2 neo EJ and autoradiography (18). Numbers refer to Bam H1 (1) and Kpn 1 (2) digestions.

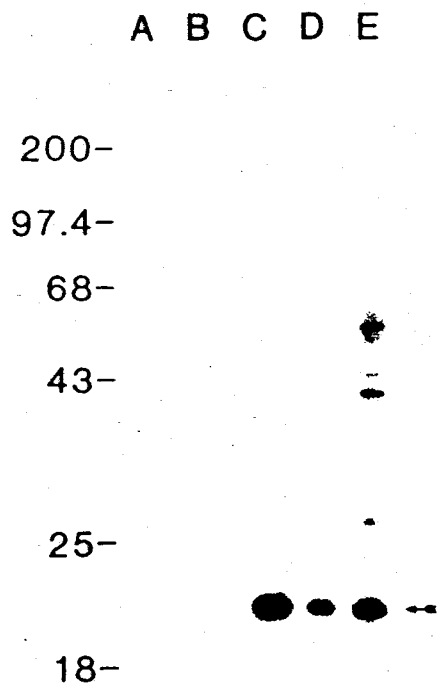


Fig.2 : Detection of the *ras* oncoprotein by immuno-precipitation. Cultures (10^6 cells) were metabolically labeled by incubation in 2 ml methionine-free DMEM medium supplemented with 200 μ Ci L-[35 S]-methionine (3000Ci/mmol; Amersham) for a period of 18 h. Cells were lysed in RIPA buffer (Tris-HCl 10mM, pH 7.4; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1 %; sodium desoxycholate 0.5 %; aprotinin 1 %) and centrifuged at 100,000 g for 1 h. The *ras* product P21 was immuno-precipitated with the monoclonal antibody Y13 - 259 (Oncogene Science, Inc.), fractionated by SDS-PAGE (12.5 % gel) and processed for fluorography (19). Migrations are as follows : lane A, NIH-3 T3; lane B, NIHneo; lane C, NIH*ras* transfectant; lane D, NIH*ras*T; lane E, NIH*ras*M. The left lane indicated the positions of marker proteins for molecular weight estimation. The expected position of P21 *ras* is indicated by an arrow.

21 kDa protein in NIHras, NIHrasT and NIHrasM and that the rearrangement does not affect the expression of the ras gene in tumor and metastatic cell lines. These observations strongly suggest that metastatic cells derive, as expected, from the primary tumor which itself derives from a single rearranged clone.

Approximately 10^7 control and ras-transfected cells used in this study were scraped off the plates in saline buffer and lyophilized. Total sialic acids were liberated with 0.1 M HCl in anhydrous methanol at 80°C for 1 hour. Subsequent methylation of the methanolysate, followed by analysis of the permethylated methyl glycoside methyl esters by g.l.c. coupled to m.s. was performed (15). Some fragments of importance in the mass-spectral analysis are shown in Fig.3. The fragmentation of Neu5Ac and Neu5Gc permethylated methyl glycoside methyl esters is similar except for the fragments containing the methylated N-glycolyl group. These fragments shifted by 30 m.u. towards larger mass for Neu5Gc. The specific fragments from Neu5Ac permethylated derivative give signals at m/e 129, m/e 348 and m/e 376. Neu5Gc permethylated derivative specific signals appear at m/e 159, m/e 378 and m/e 406.

Analysis of both reference cell lines (NIH-3T3 and NIHneo) were performed in triplicate and Neu5Gc methyl ester was never detected by g.l.c. and m.s. in the expected region of elution of this compound. By contrast, analysis of permethylated methyl glycoside methyl esters from the three ras-transfected cell lines contain a peak corresponding to Neu5Gc. Mass spectrometry analysis of that compound allowed us to identify Neu5Gc unambiguously on the basis of typical fragments described above.

Quantitative determination of the percentage of Neu5Ac and Neu5Gc was performed in duplicate for the different cell lines. As shown in Table 1, the proportion of Neu5Gc was approximately the same in the

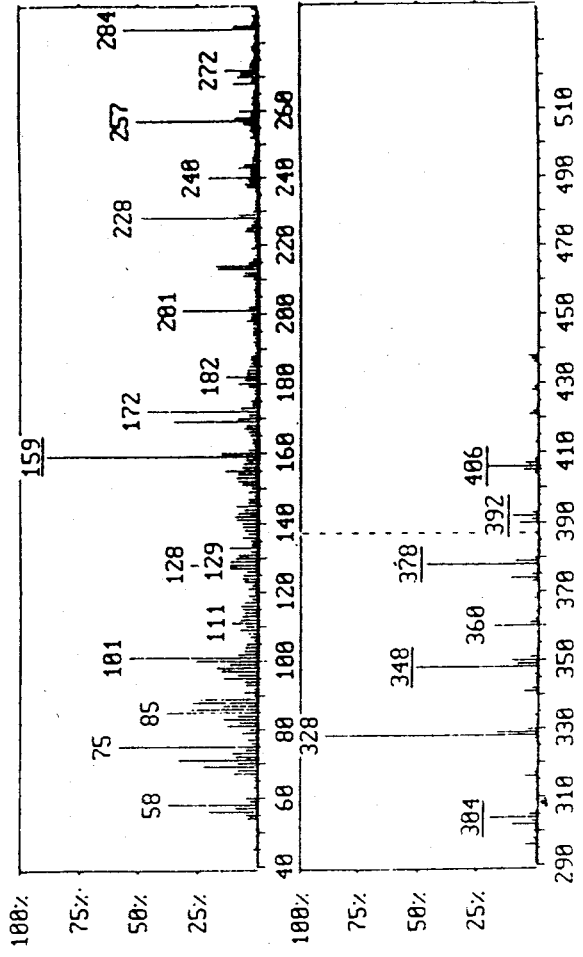
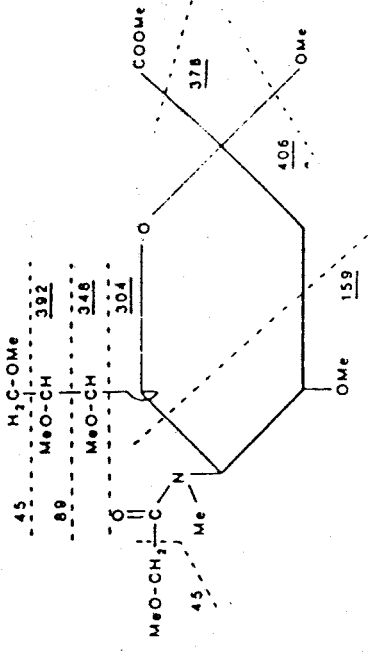
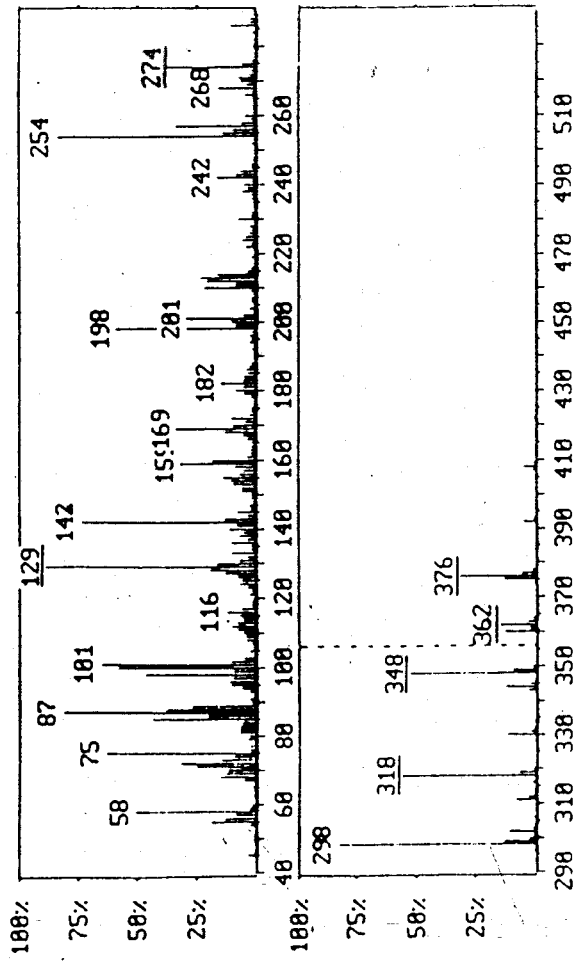
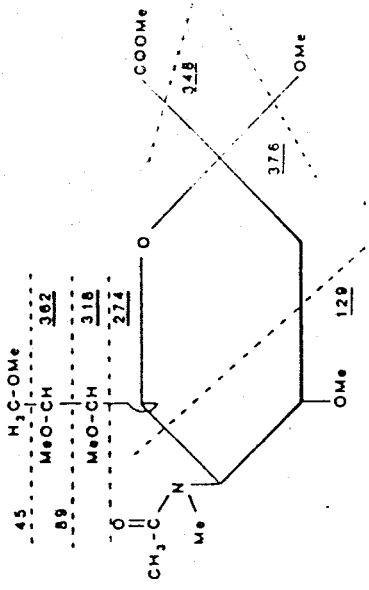


Table 1. Relative proportion of Neu5Ac and Neu5Gc methylated derivatives in the methanolysates of the different cell lines. Neuraminic acids liberated by 0.1 M HCl in anhydrous methanol at 80°C for 1 hour were methylated with methyl iodide in methyl sulfoxide in the presence of methyl sulphanyl carbanion (15). Permethylated methyl glycoside methyl esters were analysed by g.l.c. coupled m.s. as described in Fig. 3. The Neu5Gc/Neu5Ac ratio is expressed as an average value of duplicate experiments and calculated on the basis of an equimolar ratio of the permethylated derivatives of Neu5Ac (retention time : 14.02 ± 0.08) and Neu5Gc (retention time : 18.53 ± 0.10).

	CELL LINES				
	NIH-3T3	NIHneo	NIHras	NIHrasT	NIHrasM
Neu5Ac (%)	100	100	86.6	82.2	81.5
Neu5Gc (%)	-	-	13.4	17.8	18.5
Neu5Gc/Neu5Ac	-	-	0.15	0.22	0.23

different transfected cells without significant modifications in cells isolated from the primary tumors or from lung metastases.

To our knowledge, this is the first report of the appearance of Neu5Gc induced by the introduction of an activated proto-oncogene like *ras* in fibroblastic cells. The total absence of Neu5Gc in NIHneo indicated that the integration of the pSV2 neo EJ plasmid into NIH-3T3 is not sufficient to induce Neu5Gc biosynthesis and that the appearance of this compound is the result of the action of the *ras* gene. Yet, we cannot say if this process is specific of *ras* oncogene or a consequence of cell transformation. The expression of Neu5Gc by the transfectants could be the consequence of the activation of a normally dormant pathway during biosynthesis from Neu5Ac, or due to the specific triggering of the hydroxylase converting CMP-Neu5Ac into CMP-Neu5Gc, or both. Work is in progress in our laboratory to test these hypotheses.

The *ras* genes are known to induce several changes within the cell (16,17). However, the precise role of the expression of *ras* on the so far reported modifications in enzymatic activity (namely sialyltransferase, N-acetylglucosaminyltransferase V and probably other glycosyltransferases) is not known. The oncogene product may itself alter glycosylation by a general "phospho-dephospho-" regulatory mechanism, or by a cascade process involving several intermediate reactions. Further work is needed to define the role of *ras* or of other oncogenes in the development of the malignant phenotype.

REFERENCES and NOTES.

1. R. Schauer, *Cell. Biol. Monogr.* **10**, Springer-Verlag, Wien New York (1983).
2. L. A. Smets and W. P. Van Beek, *Biochim. Biophys. Acta* **738**, 237 (1984).
3. J. F. Codington *et al.*, *Cancer Res.* **43**, 4364 (1983).
4. A. P. Corfield *et al.*, *Biochem. J.* **197**, 293 (1981).
5. D. Bouhours and J. F. Bouhours, *J. Biol. Chem.* **258**, 299 (1983).
6. A. P. Sherblom and C. E. Dahlin, *J. Biol. Chem.* **260**, 1484 (1985).
7. L. Shaw and R. Schauer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 477 (1988).
8. H. Higashi *et al.*, *Cancer Res.* **45**, 3796 (1985).
9. Y. Hirabayashi *et al.*, *Japan. J. Cancer Res. (Gann)* **78**, 251 (1987).
10. G. L. Nicolson, *Adv. Viral Oncol.* **6**, 143 (1987).
11. U. V. Santer *et al.*, *Cancer Res.* **44**, 3730 (1984).
12. J. G. M. Bolscher *et al.*, *EMBO J.* **7**, 3361 (1988).
13. R. S. Kerbel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1263 (1987).
14. T. Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982)
15. J. Finne *et al.*, *Carbohydr. Res.* **80**, 336 (1980).
16. M. Barbacid, *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779 (1987).
17. A. F. Chambers and A. B. Tuck, *Anticancer Res.* **8**, 861 (1988).
18. C. J. Tabin *et al.*, *Nature* **300**, 143, (1982).
19. P. Martin *et al.*, *EMBO J.* **5**, 1529 (1986).
20. We thank Professor D. Stehelin for moral assistance, C. Lagrou and A. Honvault for excellent technical assistance. We thank also B. Van Hille for the generous gift of monoclonal antibody and J. Coll for helpfull discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, The Institut Pasteur de Lille and the Ministère de l'Education Nationale. V. L. is a fellow of the Ligue National contre le Cancer.

E - Discussion et conclusion

De nombreux protocoles d'hydrolyse des acides sialiques liés aux oligosaccharides membranaires ont été décrits (voir la revue de Schauer, 1987). Cependant ces protocoles étaient inutilisables pour notre travail et nous avons choisi, afin d'analyser le Neu5Ac et le Neu5Gc associé aux membranes cellulaires, de modifier la méthode décrite par Yu et Ledeen (1970). Les modifications sont les suivantes :

1. Méthanolyse du Neu5Ac et Neu5Gc des cellules par une faible concentration d'acide chlorhydrique (0,1 N).

2. Analyse des dérivés méthylés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Ce protocole simple nous a permis de mesurer quantitativement et qualitativement les deux acides sialiques associés à la surface cellulaire sans autre purification.

Après avoir mis au point cette technique sur des fibroblastes de Hamster *vivo*-transformés nous avons pu caractériser la modification du métabolisme de l'acide sialique dans les cellules transfectées par l'oncogène *ras*.

L'implication de l'oncogène *ras* dans l'altération des N-glycosylprotéines de membranes cellulaires a déjà été décrit par certains auteurs (Santer *et al.*, 1984 ; Bolscher *et al.*, 1988). La transformation est accompagnée d'une augmentation de l'activité sialyltransférase (Cazlaris *et al.*, 1989). Nos résultats montrent la présence de l'acide N-glycolylneuraminique dans les cellules NIHras, NIHrasT et NIHrasM et leur absence dans les cellules contrôles NIH 3T3 et NIHneo.

A notre connaissance, il s'agit de la première observation de l'apparition de Neu5Gc dans des cellules transformées par l'oncogène *ras*. L'absence de Neu5Gc dans les cellules NIHneo nous indique que l'intégration du plasmide pSV2neo n'est pas suffisante pour induire la biosynthèse de Neu5Gc, et que l'apparition de ce composé est bien le résultat de la transfection par *ras*.

CONCLUSION GENERALE

Les investigations que nous avons entreprises sur les modifications de la glycosylation des N-glycosylprotéines des cellules transformées peuvent se résumer comme suit :

1 - L'analyse des glycopeptides membranaires des cellules uro-épithéliales humaines par chromatographie d'affinité sur ConA et LCA nous a permis de caractériser les modifications des N-glycannes dans les cellules cancéreuses; les lignées cellulaires tumorigènes et invasives présentent une proportion de structures tri- et tétraantennées supérieure aux lignées cellulaires non-tumorigènes et non-invasives. Cette observation a déjà été effectuée par d'autres équipes (Yamashita *et al.*, 1984 et 1985 ; Arango et Pierce, 1986 ; Dennis et Laferté, 1987) et, à l'heure actuelle, il semble établi que la polyantennarisation des glycannes soit un marqueur de la transformation maligne des cellules.

2 - Notre étude de la modification de la glycosylation des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis à haut et à faible pouvoir métastatique par fixation des lectines radio-marquées, nous a permis de caractériser des modifications au niveau de la sialylation et de la fucosylation :

a) Une diminution de la liaison Neu5Ac(α -2,6)Gal/GalNAc des cellules à faible pouvoir métastatique.

b) Une diminution des Fuc(α -1,6) substituant les résidus de N-acétylglucosamine de l'extrémité réductrice de ces mêmes cellules.

3 - Parallèlement, nous avons effectué le dosage des acides sialiques de ces cellules. Nous avons pu montrer l'existence d'une corrélation directe entre la quantité d'acide sialique et le pouvoir métastatique des cellules. Ce résultat confirme ceux que Yogeewaran et Salk ont publié en 1981.

4 - Enfin, notre étude de la modification de l'acide sialique, réalisée sur les fibroblastes murins transformés par l'oncogène c-Ha-ras, a montré l'apparition de Neu5Gc après transfection par l'oncogène, alors que ce composé est absent des cellules de référence. Cette observation suggère que l'apparition de Neu5Gc est associée à

l'activation du gène dormant de l'hydroxylase responsable de la synthèse de ce composé par l'oncogène *ras*.

L'augmentation de la sialylation des glycanes est un phénomène généralement associé à la transformation maligne. De plus, la diminution de la sialylation est souvent observée dans les mutants résistants à l'action toxique de la WGA, présentant un faible pouvoir métastatique, (Yogeeswaran et Salk, 1981 ; Birles, 1982 ; Stanley et al., 1980). Ces observations suggèrent que l'augmentation de la sialylation des glycoconjugués de la surface cellulaire est en relation avec le comportement métastatique de cellules cancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

1. Altevogt, P., Fogel, M., Cheigson, R., Dennis, J., Robinson, P. et Schirmacher, V. (1983) *Cancer Res.* 43, 5138-5144.
2. Aswell, G. et Arford, J. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 531-554.
3. Barbacid, M. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779-827.
4. Bartles, J. R. et Hubbard, L. (1984) *Anal. Biochem.* 140, 284-282.
5. Bendiak, B. et Cook, G.M.W. (1982) *Eur. J. Biochem.* 128, 355-362.
6. Bendiak, B. et Cook, G.M.W. (1983) *Biochem. J.* 213, 253-260.
7. Berrger, E.G. et Mesford, F.J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4732-4739.
8. Birwik, L. et Coman, D.R. (1962) *Cancer Res.* (1962) 22, 982-988.
9. Birles, E. (1981) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 103, 38-45.
10. Bhavanandan, V.P. et Katlie, A.W. (1979) *J. Biol. Chem.* 245, 4000-4008.
11. Bolsher, J.G.M., Van Der Bijl, M.M.W., Neefjes, J.J., Hall, A., 12 Smets, L.A. et Ploegh, H.L. (1988) *EMBO J.* 7, 3561-3368.
13. Bosmann, H.B., Boeber, G.F., Brown, A.E., Case, K.R., Gersten, D.M., Kimmerer, T.W. et Hone, A. (1973) *Nature* 246, 487-490.
14. Bouhours, D. et Bouhours, J-F. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 299-304.
15. Brackenburg, R. (1985) *Cancer Metastasis. Rev.* 41-58.
16. Bramwell, M.E. et Harris, H.H. (1978) *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 201, 876-106.
17. Buck, C.A. Fuhrer, J.P. Soslan, G. et Warren, L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1541-1550.

- 18 Buck, C.A., Clik, M.C. et Warren, L. (1970) *Biochemistry* 10, 2176-2180.
- 19 Carlson, D.M. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 616-626.
- 20 Carlson, D.M., Sundblad, G., Hammarstro, S. et Lonngren, J. (1978) *Carbohydr. Res.*, 64, 181-188.
- 21 Cazlaris, H. (1989) Thèse, Univ. Sci. tech. Lille, Lab. Chim. Biol.
- 22 Chambers, A.F. et Tuck, A.B. (1988) *Anticancer Res.* 8, 861-872.
- 23 Christensen, B., Kieler, J., Vilien, M., Don, P., Wang, G.Y. et Wolf, H. (1984) *Anticancer Res.*, 4, 319-338.
- 24 Coman, D.R. (1944) *Cancer Res.* 4, 625-629.
- 25 Debeire, P., Montreuil, J., Mocozar, E., Van Halbeek, H et Vliegenthart, J.F.G. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 607-611.
- 26 Debray, H., Delannoy, P., Debeire, P. et Montreuil, J. (1983) *Proc. 7th Int. Symp. Glycoconj.*, Lund-Ronneby, Sweden, p.172-173.
- 27 Debray, H. et Montreuil, J. (1989) *Carbohydr. Res.* 185, 15-26.
- 28 Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G et Montreuil, J. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 41-45.
- 29 Debray, H., Qin, Z., Delannoy, P., Montreuil, M., Dus, D., Radzikowski, C., Christensen, B. et Kieler, J. (1986) *Int. J. Cancer* 37, 607-611.
- 30 Debray, H. (1989) Thèse Univ. Sci. tech. Lille,
- 31 Delannoy, P. Debray, H. et Montreuil, J. (1985) *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 301, 767-771.

- 32 Dennis, J., Waller, C., Timpl, L. et Schirmacher, V. (1982) *Nature (Lond.)* 300, 274-476.
- 33 Dennis, J. M. et KERBEL, R.S. (1981) *Cancer Res.* 41, 98-104.
- 34 Deniss, J.M., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M.L. et Kerbel, R.S. (1987) *Science* 236, 582-585.
- 35 Dennis, J., Donaghue, T., Florian, M. et Kerbel, R.S. (1981) *Nature (Lond.)* 92, 242-245.
- 36 Deniss, J.M. et Leferts, S. (1987) *Cancer Metastasis Rev.*, 5, 185-204.
- 37 De Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, K., Noguchi, S., Nishimura, S., Mirura, K., Ohtsuka, E., et Kim, S. (1988) *Science*, 239, 888-893.
- 38 Dus, D., Budzynski, D. et Radzikowski, C. (1985) *Arch. Immunol. Ther. Exper.*, 33, 817-823.
- 39 Finne, J., Krusius, T., et Pauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.
- 40 Finne, J., Tao, T. et Burger, M.M. (1980) *Cancer Rea.* 40, 2580-2587.
- 41 Finne, J. (1985) *T.I.B.S.* 111, 129-132.
- 42 Finne, J. et Makelä, P.M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1265-1270.
- 43 Fraker, P.J. et Speck, J.C. (1978) *Biocim. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857.
- 44 Fukuda, M.N., Dell, A., Oate, J.E. et Fukuda, M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6623-6631.
- 45 Fukuda, M. et Fukuda, M.N. (1984) in "The Biology of Glycoproteins"

(Rayamond, J. Ivatt ed) Plenum Press. New York and London. 183-224.

- 46 Furth, M.E., Aldrich, T.H. et Cordon-Carlo, C. (1987) *Oncogene* 1, 47-58.
- 47 Gallatin, M., Johan, T.P.S., Siegeman, M., Reichert, E.C. et Weissman, L.L. (1986) *Cell* 44,673-680.
- 48 Grant, C.W.M. et Peter, M.W. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* 779, 403-422.
- 49 Grimes, W.J. (1970) *Biochemistry* 9, 5083-5089.
- 50 Hagag, N., Lacal, J-C., Graber, M., Aranson, S. et Viala, M.V. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 1984-1988.
- 51 Hakomori, S.I. (1983) in "Sphingolipid Biochemistry", Kenfer, J.N. and Hakomori, S.I. eds Plenum Press. New York and London, 327-373.
- 52 Hakomori, S.I. (1983) in "Sphingolipid Biochemistry", Kenfer, J.N. and Hakomori, S.I. eds Plenum Press. New York and London, 1-5.
- 53 Hakomori, S.I. et Kannagi, R. (1983) *J. Natl. Cancer Inst.*, 71, 231-251
- 54 Hakomori, S.I. (1985) *Cancer Res.* 45, 2405-2414.
- 55 Haksar, A., Maudsley, D.V., Kimmel, G.L., Peron, F.G., Robidoux, Kondo, T., Fukuda, M. et Osawa, T. (1977) *Carbohydr. Res.*, 58, 405-414.
- 56 Haverkamp, J., Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.C., PFEIL, R. et Schauer, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 305-311.
- 57 Krusis, T. et Finne, J. (1981) *Carbohydr. Res.* 90, 203-214
- 58 Harford, J., Klausner, R.D. et Ashwell, G. (1984) *Biol. Cell* 51, 173-180.



- 59 Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, H., Matsumoto, M., Ueda, S. et Kato, S. (1985) *Cancer Res.* 45, 3796-3802.
- 60 Hirabayashi, Y., Kasakura, H., Matsumoto, M., Higashi, H., Kato, S., Kasai, N. et Naiki, M. (1987) *Japan. J. Cancer Res. (Gann)*. 78, 251-266.
- 61 Holzhauser, R. et Faillard, H. (1988) *Carbohydr. Res.* 183, 89-95.
- 62 Hubbard, S.C. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16403-16411.
- 63 Jainchill, J.S., Aronson, S.A. et Todaro, G.S. (1969) *J. Virol.* 4, 549-553.
- 64 Jurnak, F. (1988) *Trans. Biochem. Sci.* 13, 195-198.
- 65 Jeanloz, R.W. et Codington, J.F. (1976) in "Biological Roles of Sialic Acid" Rosenberg, A., Schengrund, G-L. eds., Plenum Press., New York, 201-238.
- 66 Joziasse, D.H., Schiphorst, W.F.CM., Van den Eijuden, D.H., Van Kuik, J.A., Van Halbeek, M. et Vilegenthart, J.F.G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 714-719.
- 67 Kelm, S., Shukla, A.K., Paulson, J.C. et Schauer, R. (1986) *Carbohydr. Res.* 149, 59-64.
- 68 Kemp, R.B. (1970) *J. Cell Sci.* 6, 751-766.
- 69 Kieler, J. (1984) *Cancer Metast. Res.* 3, 265-296.
- 70 Kolb-Bachoffen, ., Schlepper-Schafer, J., Teradeira, R., Vogt, D. et Kolb, H. (1983) in *Structure Carbohydrates in the Liver*, Falk Symp. 34, Poper, H., Reutter, W., Gudat, F., Kottgen, E. eds MTP Press Limited, lancaster, 277-286.
- 71 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680-685.

- 72 Leviane, E.M., Becker, Y., Bonne, C.W. et Eagle, H. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 53, 35
- 73 Lloyd, C. (1975) Biol. Ref. 50, 325-350.
- 74 Loomes, L.M., Uemura, K. et Feizi, T. (1985) Infect. Immun. 47, 15-12.
- 75 Mac cay, R.D., Vnur, E.R. et Tray, F.A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12695-12699.
- 76 MacPherson, I. et Stocker, M. (1962) Virology, 16, 147-151.
- 77 Matgas, G.R., Aaronson, S.A., Brady, R.O. et Fishman, P.H. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 84, 6065-6068.
- 78 Marchesi, V.T., Furthmagre, H. et Tomita, M. (1976) Annu. Res. Biochem. 45, 667-698.
- 79 Mauro, J.R., Narashiman, S., WETMORE, S., Riodan, J.R. et schachter, H. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 269-277.
- 80 Mesford, J.F., Berger, E.G. et Van Halbeek, H. (1984) Glycoconjugate J. 1, 141-145.
- 81 Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R. et Delmotte, F. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 147-153.
- 82 Montreuil, J. (1983) in "Vertebrate Lectins", K. Olden et J.B. Perent eds., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1-29.
- 83 Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. et Delannoy, P. (1983) in "Structural Carbohydrates in the Liver", Popper, M., Reutter, W., Köttgen, E. et Gudat, F. eds., MTP Press, Boston, 239-258.
- 84 Montreuil, J. (1975) Pure and Appl. Chem. 42, 413-477.

- 85 Montreuil, J. (1982) in "Comprehensive Biochemistry, Vol 19B, II", Neuberger, a. et Van Deenen, L.L.M. eds., Elviesier, Amsterdam, 1-188.
- 86 Nilsson, B., Norden, N.E. et Sevansson, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4545-4553.
- 89 Nicolson, G.L. (1984) Exp. Cell. Res. 150,3-22.
- 90 Nicolson, G.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 695, 113-176.
- 91 Ohta, N., Pardee, A.B., Burger, M.M., Bradley, R.M. et McAuslan, B.R. (1968) Biochim. Biophys. Acta. 158, 98-101.
- 92 Olden, K., Parent, J.B. et White, S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 650, 209-232.
- 93 Olden, K., Pratt, R.M. et Yamada, K.M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76, 3343-3347.
- 94 Pardee, A. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 417, 153-171.
- 95 Passantiti, A. et Hart, G.W. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7591-7603.
- 96 Paulson, J.C. Rearick, J.I. et Hill, R.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2363-2371.
- 97 Paulson, J.C., Pieels, J.P., Glasgow, L.R. et Hill, R.L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5617-5624.
- 98 Paulson, J.C., Rogers, G.N., Carroll, S.M., Higa, H.H., Pritchett, T., Milks, G. et Sabesau, S. (1984) Pure and Appl. Chem. 56, 797-805.
- 99 Paulson, J.C., Sadler, J.E. et Hill, R.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2120-2124.
- 100 Pierce, M. et Arango, J. (1986) J. Biol; Chem. 261, 10772-10777.

- 101 Pierce, M., Arango, J., Tahir, S.H. et Hindsgaul, O. (1987)
Biochim. Biophys. Acta. 146,679-684.
- 102 Pinnaduweg, P.D., Bhavanandan, V.P. et Davidson, E.A. (1986)
Carbohydr. Res. 151, 37-50.
- 103 Ray, P.K. (1977) Adv. Appl. Microbil. 21, 227.
Reading, G.L., Penhoet, E.E. et Ballou, C.E. (1978) J. Biol. Chem.
253, 5600-5612.
- 104 Reading, C.L., Belloni, P.N et Nicolson, G.L. (1980) J. Natl.
Cancer Inst. 64, 1241-1249.
- 108 Rutter, W. et Bauer, C.H. (1978) in " Morris Hepatomas Mechanisms
of Regulation", Morris, H.P. et Criss, W.E., eds., Plenum Press,
New York, 405-437.
- 109 Rutter, W., köttgen, E., Bauer, C et Gerok, W. (1982) in "Sialic
Acids: Chemistry, Metabolism and Function", Schauer, R. eds.,
Springer-Verlag Inc., New YORK, 263-305.
- 110 Sadler, J.E. (1984) Biosynthesis of glycoproteins : Formation of
O-linked oligosaccharides in "Biology of Carbohydrates" 2, V.
Ginsburg and P.W. Robins eds., Wiley New-York, 199-288.
- 111 Sadler, J.E., Paulson, J.C. et Hill, R. (1979) J. Biol. Chem. 254,
2112-2119.
- 112 Santer, U.V., Gilbert, F. et Glick, M-C. (1984) Cancer Res. 39,
1026-1034.
- 113 Schauer, R. (1978a) Methods. Enzymol. 50C, 64-89.
- 114 Schauer, R. (1978b) Methods. Enzymol. 50C, 374-386.
- 115 Schauer, R. (1982) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40, 131-234.
- 116 Schauer, R. (1983) Biochem. Soc. Trans. 11, 270-271.

- 117 Schauer, R. (1982) in "Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function", Schauer, R. eds., Springer-Verlag Inc., New YORK, 32639.
- 118 Schauer, R. (1985) T.I.B.S. 117, 357-360.
- 119 Schirmacher, V., Altevogt, P., Fogel, M., Dennis, J.M., Weller, C.A., Barz, D., Schwartz, R., Cheingsong-Popov, R., Springer, G., Robinson, P.J., Nebe, T., Brossmer, W., Vlodaysky, I., Paweletz, N., Zimmerman, H.P. et Uhlenbruck, G. (1982) Invas. Metastasis 2, 213-360.
- 120 Sharon, N. et Halane, L. (1986) The lectines: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Liener, I.E., Sharon, N. and Golsdtein, I.J. eds. 266-285.
- 121 Shaw, L. et Schauer, R. (1988) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 369, 477-486.
- 122 Sherblom, A.P. et Dahlin, C.E. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1484-1492.
- 123 Shibuva, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsiba-lubaki, M., Peeters, B. et Peumans, W. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1596-1601
- 124 Slomiany, A. et Slomiany, B.L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7301-7306.
- 125 Smith, D.F. et Ginsburg, V. (1980) J. Biol. Chem. 255, 55-59.
- 126 Spik, G., Coddeville, B. et Montruil, J. (1988) Biochimie, 70, 1459-1469.
- 127 Stlanley, P., Sudo, T. et Caver, J.P. (1980) J. Cell Biol. 80, 60-90.
- 128 Stlanley, P. (1984) Annu. Res. Genet. 18, 525-552.
- 129 Stacey, D.W. et Kung, H-F. (1984) Nature 310, 508-511.

- 130 Stacey, D.W., Watson, T., Kung, H-F. et Curran, T. (1987) *Mol.Cell Biol.* 7, 523-527.
- 131 Strecker, G., Peers, M.C., Michalski, J.-C., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montruil, J., Farriaux, J.-P. et Durand, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 391-403.
- 132 Strecker, G. et Michalski, J.-C. (1978) *FEBS Lett.* 85, 20-24.
- 133 Strecker, G. et Montreuil, J. (1971) *Clin. Chim. Acta.* 268, 590-595.
- 134 Taniguchi, S., Kawano, T., Mitsudomi, T., Kinura, G. et Baba, T. (1986) *Jpn. J. Cancer Res. (GANN)* 77, 1193-1197.
- 135 Tao, t.-W. et Burger, M.M. (1982) *Int. J. Cancer.* 29, 425-430.
- 136 Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., Iwanaga, S. et Kobata, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8548-8553.
- 137 Todaro, G.F. et Green, H. (1963) *J. Cell Biol.* 17, 299-313.
- 138 Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6757-6761.
- 139 Tuppy, H. et Gottschalk, A. (1972) in "Glycoproteins" Their Composition, Structure and Function (Gottschalk, A., ed.), 2nd ed., Elsevier Publishing Co., Amsterdam. 403-409.
- 140 Van Den Eijden, D.H., Joziassse, D.H., Dorland, L., Van Halbeek, L., Vliegthart, J.F.G. et Schmid, K. (1980) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 92, 839-845.
- 141 Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1975.
- 142 Warren, L., Fuhrer, J.P. et Buck, C.A. (1972) *Proc. Natl. Aca. Sci. U.A.S.* 69, 1868-1842.

- 143 Warren, L., Buck, C.A. et Tuszynski, G.P. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 516, 97-127.
- 144 Weinstein, J., De Souza, U. et Paulson, J.C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13835-13844.
- 145 Yamashita, K., Hitoi, A. et Kobata, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 14753-14755.
- 146 Yamashita, K., Okhura, T., Tachibana, Y. Takasaki, S. et Kobata, A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10834-10840.
- 147 Yamashita, K., Kochibe, N., Ohkura, T., Ueda, I. et Kobata, K. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4688-4693.
- 148 Yarnel, M.M. et Ambrose, E.J. (1969) Eur. J. Cancer 5, 265-271.
- 149 Yasue, S., Hunda, S., Miyagawa, S., Inoue, J., Hasagawa, A. et Yamakawa, T. (1978) J. Biochem. (Tokyo) 83, 1101-1107.
- 150 Yogeeswaran, G. et Tao, T. (1980) Biochim. Biophys. Res. Commun. 95, 1452-1460.
- 151 Yogeeswaran, G. et Salk, P. (1981) Science 212, 1514-1516.
- 152 Yoshima, H., Furthmagr, H et Kobata, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9713-9718.
- 153 Yu, R.K. et Ledeen, R.W. (1970) J. Lipid Res. 11, 506-516.
- 154 Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. et Vincendon, G. (1972) J. Chromatogr. 69, 291-304.
- 155 Zavada, J. et Mac Pherson, I. (1970) Nature 225, 24-26.

