

50376
1990
327

50376
1990
327
N° d'ordre : 658

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

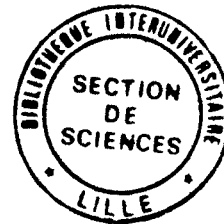
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS**

Option : Sciences de la vie et de la santé

par

Nadia LE MARER



**MODIFICATIONS DE LA SIALYLATION ET DES ACTIVITES
SIALYLTRANSFERASIQUES DE FIBROBLASTES DE RAT TRANSFORMES
PAR DIFFERENTS ONCOGENES**

Soutenue le 21 décembre 1990 devant la Commission d'Examen

Président : Professeur J. Montreuil
Rapporteurs : Professeur A. Verbert
Docteur M. Aubery
Examineurs : Professeur D. Stéhelin
Docteur P. Delannoy

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	6
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 : GENERALITES	11
<u>I - CANCER ET TRANSFORMATION CELLULAIRE</u>	
<u>A - Transformation cellulaire</u>	12
<u>B - Genèse des cancers</u>	13
<u>II - VIRUS ONCOGENES ET ONCOGENES</u>	15
<u>A - Oncogènes</u>	15
1 - Stratégie d'isolement des oncogènes par le test 3T3	16
2 - Activation d'un oncogène cellulaire	18
3 - Implication des oncogènes dans le métabolisme cellulaire	20
a - Facteurs de croissance	20
b - Récepteurs de facteurs de croissance	20
c - Effecteurs cytoplasmiques ou seconds messagers	22
d - Facteurs de transcription	23
<u>B - Coopération d'oncogènes</u>	23
1 - <i>in vitro</i>	23
2 - <i>in vivo</i>	25
<u>C - Anti-oncogènes</u>	26
<u>D - L'oncogène ras</u>	27
1 - Présentation	27
2 - La protéine p21ras	28
3 - Mécanisme d'action de <u>ras</u>	29

a - Signaux en amont	29
b - Signaux en aval	30
4 - Les familles <u>ras</u>	32
III - <u>GLYCOCONJUGUES CELLULAIRES</u>	35
A - <u>Structure</u>	35
1 - Les constituants	35
2 - Les O-glycosylprotéines	36
3 - Les N-glycosylprotéines	
B - <u>Conformation des N-glycannes</u>	40
1 - Conformation des N-glycannes	40
2 - Implications de la conformation spatiale dans le comportement biologique des glycannes	41
C - <u>Biosynthèse des glycannes des N-glycosylprotéines</u>	43
D - <u>Les sialyltransférases</u>	43
1 - Localisation	45
2 - Purification et caractérisation	45
3 - Séquençage et clonage	49
4 - Régulation	49
E - <u>Rôle des glycannes membranaires</u>	52
1 - La "surface cellulaire", siège des interactions	53
a - La membrane cellulaire	53
b - Matrice extracellulaire et cytosquelette	54
2 - Rôle des acides sialiques	55
IV - <u>TRANSFORMATION CELLULAIRE ET MODIFICATIONS DE LA GLYCOSYLATION</u>	57
A - <u>Multi-antennarisation</u>	58
B - <u>Augmentation de la sialylation</u>	59
C - <u>Augmentation de la proportion des glycannes portant un résidu de N-Acétylglucosamine en position "intercalaire"</u>	62

V- <u>CONCLUSION</u>	62
CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION	64
MEMOIRE I : Etude des modifications de la sialylation des cellules BHK21/C13 après transfection <i>in vitro</i> par l'oncogène Humain <u>c-Ha-ras</u>.	65
Introduction	66
Mémoire	67
Conclusion	84
MEMOIRE II : Augmentation de l'activité α-2,6-sialyltransférase dans des fibroblastes de Rat (FR3T3) transformés par l'oncogène <u>c-Ha-ras</u>.	87
Introduction	88
Mémoire	91
Conclusion	125
CHAPITRE 3 : CONCLUSION GENERALE	127
BIBLIOGRAPHIE	130
APPENDICE TECHNIQUE	151
<u>I- CULTURE CELLULAIRE ET ANALYSES</u>	152
<u>A - Milieux et solutions pour la culture cellulaire</u>	152
1 - Milieu D10 SCF	152
2 - Solution VT (Versène-Trypsine)	152
3 - Milieu de congélation	152

B - <u>Cultures cellulaires</u>	152
1 - Mise en culture d'une souche congelée	153
2 - Entretien d'une souche	153
3 - Production de cellules en masse	153
4 - Comptage de cellules	153
5 - Congélation d'une souche	154
6 - Microscopie et photographie des cultures	154
C - <u>Techniques d'analyse des ARNs messagers (Northern Blot)</u>	154
1 - Extraction des ARNs	154
2 - Centrifugation sur coussin de césium	154
a - Electrophorèse-test	155
b - Gel d'agarose dénaturant	155
c - Transfert sur nitrocellulose	155
3 - Transfert sur nitrocellulose	155
4 - Préparation des sondes ADN et radiomarquages par translation de coupure	156
5 - Hybridation moléculaire	156
D - <u>Analyse protéique</u>	157
1 - Marquage métabolique des cellules par la méthionine ³⁵ S	157
a - Culture des cellules	157
b - Marquage des cellules	157
2 - Immunoprécipitation	157
3 - Electrophorèse	158
4 - Traitement du gel	158
<u>II - CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES DE SURFACE CELLULAIRE</u>	158
<u>A - Identification des protéines membranaires par des lectines radio-marquées</u>	158
1 - Radio-iodination des lectines	159
2 - Solubilisation des protéines membranaires	159
3 - Séparation des glycoprotéines en gel polyacrylamide en milieu dénaturant	159
4 - Visualisation des glycoprotéines par incubation avec les lectines radio-marquées	159

B - <u>Etudes des modifications de la sialylation de la surface cellulaire par des lectines marquées à la fluorescéine en microscopie à fluorescence</u>	160
1 - Marquage des lectines au FITC	160
2 - Marquage des cellules par la lectine-FITC	160
III - <u>DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	161
A - <u>Dosage de l'hydroxylase</u>	161
1 - Préparation des homogénats cellulaires	161
2 - Incubation	161
3 - Séparation des acides sialiques Neu5Ac et Neu5Gc	161
B - <u>Dosage des sialyltransférases</u>	161
1 - Préparation des homogénats cellulaires	161
2 - Incubation	162
3 - Préparation des accepteurs	162
4 - Détermination du taux de transfert	163
a - Accepteurs asialo-glycoprotéiniques	163
b - Accepteurs asialo-glycopeptidiques	163
c - Accepteurs oligosaccharidiques	163

REMERCIEMENTS

Mr Montreuil, je tiens tout d'abord à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire, et m'avoir ainsi communiqué, pendant toutes ces années, la passion de la Biochimie. Je vous remercie d'être le président du jury de cette thèse. Que ce travail soit le témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

Philippe Delannoy, je n'oublierai pas le travail que nous avons fait ensemble. Ta rigueur expérimentale et nos discussions stimulantes m'ont été d'un apport très formateur et je t'en remercie. Que ce jour soit pour moi l'occasion de t'exprimer mes remerciements les plus sincères.

Mr Verbert, vous avez apporté dans ce travail une collaboration fructueuse. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Mr Stéhelin, grâce à vous j'ai pu faire connaissance avec les oncogènes et la Biologie Moléculaire. C'est dans le cadre d'une collaboration chaleureuse, compétente et dynamique avec votre équipe que nous avons pu réaliser ces travaux. Je vous en remercie et suis très honorée que vous ayez accepté d'être du jury de cette thèse plus "biochimique" qu'"oncologique".

Melle Aubery, Je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse, de bien vouloir juger ce travail.

Ma gratitude va à Henri Debray qui m'a aidée à faire mes premiers pas dans le domaine de la recherche fondamentale et qui m'a initiée à l'exploration ardue des membranes biologiques.

Elle va également à Haris Cazlaris, grâce à qui ont débuté au laboratoire, les recherches sur l'effet des oncogènes sur la biosynthèse des glycoprotéines membranaires.

Je tiens aussi à remercier Gérard Strecker, pour m'avoir apporté son aide à un moment décisif de mes travaux en m'apportant tout son savoir-faire en matière de structure des sucres et en nous offrant les oligosaccharides dont nous avons besoin pour nos expériences.

Vincent Laudet, tu as participé efficacement à ces travaux, de par ton dynamisme et grâce à tes précieux conseils d'oncologiste. Je ne saurai l'oublier, et je t'en remercie.

Christian Lagrou (Papy), j'ai eu grand plaisir à travailler à tes côtés. Tu as su m'initier à la culture cellulaire avec rigueur et patience en me prodiguant de nombreux conseils. Je t'en remercie.

Je suis également très reconnaissante à Catherine Hänni et Jean Coll qui ont participé à la correction de ce mémoire.

Je ne saurais oublier l'aide que m'a apportée Brigitte Quatannens dans les travaux que nous avons réalisés ensemble, dans la joie et la bonne humeur. Merci encore.

Un grand merci à Yves Plancke (Papy) et Frank Delannoy avec qui j'ai fait équipe pendant ces trois ans.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de Chimie Biologique et du laboratoire d'Oncologie Moléculaire de l'Institut Pasteur qui ont été des camarades de travail, toujours présents dans les bons et les mauvais moments.

Je remercie aussi sincèrement Nicole Devassine et Marie Christine Bouchez qui m'ont apporté une aide appréciable pour la frappe de ce mémoire.

ABBREVIATIONS

- α -2,6ST : Gal α -2,6-sialyltransférase
 α -2,3ST : Gal α -2,3--sialyltransférase
 Ara : Arabinose
 DMEM : Milieu de culture de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
 D 10 FCS : milieu DMEM additionné de 10 % de FCS
 DMSO : Diméthylsulfoxyde
 dpm : désintégrations par minute
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 RNA Acide ribonucléique
 EDTA : Ethylène-Diamine Tétra-Acétate
 FCS : Fetal Calf Serum, sérum de veau fœtal
 FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
 FR3T3 : Fibroblastes de Rat
 FRBPV1 : Fibroblastes de Rat infectés par le virus du papillome bovin
 FRmyc : Fibroblastes de Rat transfectés par l'oncogène v-mycOK10
 FRmyc+ras : Fibroblastes de Rat transformés par la coopération de v-mycOK10 et de c-Ha-ras
 FRmT : Fibroblastes de Rat transformés par le gène transformant (middle T) du polyome.
 FRras : Fibroblastes de Rat transformés par l'oncogène c-Ha-ras
 FRsrc : Fibroblastes de Rat transformés par l'oncogène v-src
 Fuc : L-Fucose
 Gal : D-Galactose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine
 Glc : D-Glucose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine
 Man : D-Mannose
 Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique
 Neu5Gc : Acide N-glycolylneuraminique
 PBS : Phosphate-Buffered Saline, solution-tampon de phosphate
 RER : Reticulum Endoplasmique Rugueux
 RSV : Rous Sarcoma Virus
 SNA : Sambucus nigra Agglutinine, lectine de sureau

INTRODUCTION

La transformation maligne conduit à de profonds remaniements du métabolisme cellulaire qui se traduisent par des modifications de l'organisation du cytosquelette conduisant à un changement de la morphologie des cellules, une augmentation du nombre de mitoses, une perte de l'inhibition de contact et une diminution de l'adhésion cellulaire. L'ensemble a pour conséquence une prolifération anarchique des cellules transformées. La transformation cellulaire s'accompagne d'une perturbation de la perméabilité membranaire et de modifications structurales des composants de la surface cellulaire faisant apparaître des néoantigènes. En outre, elle affecte profondément la glycosylation de la surface membranaire. Cette dernière modification se caractérise par une simplification des glycolipides et une augmentation de la taille des glycanes des N-glycosylprotéines, consécutive à une augmentation du nombre des antennes du type N-acétyllactosaminique et à une hypersialylation de ces structures. Ces réarrangements structuraux s'expliquent par des variations des activités des glycosyltransférases, et en particulier, par l'augmentation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V et des sialyltransférases spécifiques des structures N-glycosidiques. Compte-tenu du rôle essentiel que jouent ces structures glycaniques dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire, ces modifications structurales sont vraisemblablement impliquées dans les phénomènes de cancérisation et, plus particulièrement, dans les mécanismes de la métastase. A cet égard, la présence de structures poly-antennées et poly-sialylées semble être l'une des conditions nécessaires pour que les cellules transformées acquièrent leur capacité métastatique.

Par ailleurs, il apparaît, depuis quelques années, que les cellules transformées, après transfection par des oncogènes, présentent des modifications structurales de glycanes similaires à celles observées lors de transformations virales ou chimiques.

Afin de tenter de mieux définir les raisons de ces modifications structurales et, en particulier, de l'augmentation de la sialylation des cellules transformées, nous nous sommes intéressée aux modifications des activités sialyltransférasiques, spécifiques des N-glycosylprotéines, à savoir la β -galactoside- α -2,3-sialyltransférase et la β -galactoside- α -2,6-sialyltransférase. Pour cette étude, nous avons utilisé comme modèles cellulaires des fibroblastes de rein de Hamster (cellules BHK) transformées par l'oncogène ras, et dans un deuxième temps, des fibroblastes de Rat (cellules FR3T3) transformées par différents oncogènes dont l'oncogène ras.

Nous avons également montré que la transformation des cellules par l'oncogène ras conduisait à une augmentation des activités sialyltransférasiques et, en particulier, que cet oncogène activait considérablement la β -galactoside- α -2,6-sialyltransférase des fibroblastes de Rat. De plus, nous avons pu montrer que cette augmentation d'activité était la conséquence d'une augmentation du taux d'expression de cette enzyme. Ce phénomène a un impact évident sur la sialylation de la surface cellulaire au niveau de laquelle nous avons pu mettre en évidence une forte augmentation de la

séquence terminale Neu5Ac(α 2-6)Gal. Cette augmentation d'activité n'ayant pas été observée avec les autres oncogènes étudiés, tout porte à croire que ce phénomène est spécifique de l'oncogène ras. Les résultats de cette étude présentés dans cette thèse font l'objet de deux mémoires soumis pour publication. En outre, ils ont fait l'objet des communications et des publications suivantes :

Communications :

- 1 - N. Le Marer, Q. Zhu, V. Laudet, H. Cazlaris, P. Delannoy et J. Montreuil.
Caractérisation de l'acide N-glycolylneuraminique dans différentes lignées de fibroblastes transfectés par l'oncogène humain c-Ha-ras.
XIII^e Journées de la Chimie et Biochimie des Glucides. First mediterranean Conference on Carbohydrates, Avignon, 20-23 Mai 1990, p.25. (Poster).
- 2 - N. Le Marer, V. Laudet, C. Lagrou, J. Montreuil et P. Delannoy.
Modifications de la sialylation et des activités sialyltransférasiques des fibroblastes de Rat FR3T3 transfectés par les oncogènes v-myc et c-Ha-ras.
XVII^e Forum des Jeunes Chercheurs, Biochimie et Biologie Moléculaire, Villeneuve d'ascq, 3-6 juillet 1990, p. 44. (Communication orale).
- 3 - N. Le Marer, V. Vandamme, V. Laudet, C. Lagrou, J. Montreuil et P. Delannoy.
Increase of Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-R) : α -2,6-sialyltransferase activity in FR3T3 Rat fibroblasts transfected with c-Ha-ras human oncogene.
Conferences J. Monod, Aussois, 22-27 octobre 1990. (Poster).

Publications :

- 1- H. Cazlaris, N. Le Marer, V. Laudet, C. Lagrou, Q. Zhu, P. Delannoy and J. Montreuil.
Modifications de la sialylation des cellules BHK21/C13 après transfection in vitro par l'oncogène Humain c-Ha-ras.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1990, accepté.
- 2- N. Le Marer, V. Laudet, H. Cazlaris, N. Salomé, C. Lagrou, D. Stéhelin and P. Delannoy.
The c-Ha-ras oncogene induces an increase of the expression of the β -Galactoside- α -2,6-sialyltransferase in Rat Fibroblasts (FR3T3) cells.
Sera soumis pour publication à J.Biol. Chem.

CHAPITRE 1 : GENERALITES

I - CANCER ET TRANSFORMATION CELLULAIRE

La tumeur maligne ou néoplasme se définit par une croissance anarchique de tissu, non coordonnée avec les tissus normaux adjacents (Willis et Willis, 1972). Cette croissance pathologique se distingue de la prolifération réparatrice et de l'hyperplasie. En effet, les cellules néoplasiques continuent à se multiplier, formant une masse croissante de tissu.

De même, la cessation de stimuli impliqués dans la croissance cellulaire entraîne l'arrêt des mitoses d'un tissu normal mais pas celles du tissu cancéreux : l'inhibition de contact est abolie. La prolifération peut continuer indéfiniment après les modifications provoquées par un agent carcinogène et la tumeur peut être transplantée ou propagée par culture *in vitro* en gardant ses propriétés néoplasiques.

Les cellules de tumeur bénigne montrent une certaine analogie avec les cellules normales contrairement aux cellules malignes qui se trouvent fortement dédifférenciées. Leur croissance est lente et n'est pas invasive. Une tumeur maligne se caractérise par la capacité qu'ont les cellules à envahir les tissus environnants et à s'infiltrer dans les vaisseaux produisant dans certains cas des métastases.

La métastase ou tumeur métastatique est une tumeur dérivant de la tumeur primaire et située à distance de celle-ci. Le processus donnant naissance à de telles tumeurs secondaires est classiquement décrit comme une cascade d'événements comportant la dissociation spontanée du tissu tumoral, l'infiltration des cellules tumorales dans la circulation, puis l'arrêt des cellules au niveau du tissu cible (voir les revues de Nicolson, 1982 ; Parish *et al.*, 1987).

A - Transformation cellulaire

Divers agents tumorigènes (d'origine virale, chimique ou physique) peuvent entraîner la transformation cellulaire et l'apparition de tumeurs *in vivo* (Bishop, 1987).

La cellule transformée est l'objet d'un dérèglement des mécanismes gouvernant la prolifération et la différenciation cellulaire. La notion de cellule transformée est une notion relative reposant sur certains critères de transformation. *In vivo*, la détection d'un état transformé se fait par la visualisation de tumeurs formées après inoculation à un animal syngénique ou immunodéprimé. *In vitro*, la transformation cellulaire peut être caractérisée par diverses modifications morphologiques, comportementales et/ou biochimiques affectant les cellules.

En effet, la cellule transformée en culture peut présenter une série de modifications phénotypiques évidentes. Elle devient sphérique et réfringente traduisant ainsi les changements que subit son cytosquelette, ce qui peut être observé par l'étude en immunofluorescence des filaments d'actine.

Par ailleurs, la cellule transformée montre une abolition du contrôle de la croissance cellulaire ; elle a un cycle cellulaire plus court et des mitoses plus fréquentes. D'autre part, on peut observer la perte de l'inhibition de contact, c'est à dire que les cellules à confluence continuent à proliférer en formant des foyers tridimensionnels.

On peut observer aussi une diminution de l'adhésivité cellulaire. Des modifications de la membrane plasmique, comme par exemple la diminution du taux des protéines d'adhésion cellulaires telle que la fibronectine, peuvent être visualisées par immunofluorescence.

Cette diminution de l'adhésivité cellulaire peut correspondre à la capacité de certaines cellules à pousser en milieu semi-solide (milieu gélosé), capacité utilisée comme test de la transformation cellulaire. En effet, le nombre de clones obtenus permet d'évaluer le taux de transformation cellulaire.

Alors que la cellule normale nécessite la présence de certaines hormones et de facteurs de croissance dans le milieu de culture, la cellule transformée devient indépendante vis-à-vis de ces substances et peut, dans certains cas, se maintenir en vie dans un milieu minimum.

La transformation cellulaire s'accompagne de modifications biochimiques de la membrane cellulaire avec une altération des glycolipides et des glycoprotéines membranaires et l'apparition de nouveaux antigènes de surface (néo-antigènes), devenant marqueurs de la transformation (Neville, 1986). Par ailleurs, elle peut aussi s'accompagner d'une augmentation de la sécrétion d'enzymes protéolytiques pouvant contribuer à la dégradation de la matrice extra-cellulaire des tissus environnants et permettre ainsi l'infiltration des cellules malignes dans le tissu hôte (Nicolson, 1982) (Fig. 1 page 14) .

B - Genèse des cancers

C'est au début des années 70 que s'éveille la notion d'"oncogène ou de gène de cancer". Cette notion repose sur certains faits : la perception de l'existence d'une prédisposition héréditaire à certains cancers, la présence de modifications chromosomiques au niveau de certains cancers, et l'impact des agents mutagènes dans la cancérogénèse. Mais c'est surtout l'analyse expérimentale de virus pathogènes qui a permis de manifester en premier l'existence de "gènes de cancer", (Bishop, 1985).

Depuis la découverte du premier proto-oncogène cellulaire *c-src* par D.Stéhelin en 1976, grâce à la sonde *v-src* isolée du virus de sarcome de Rous (RSV), agent responsable de la transformation cellulaire, il a pu être établi une théorie unificatrice des cancers selon laquelle il existerait dans la cellule des gènes (proto-oncogènes) susceptibles d'être activés par une modification accidentelle due à l'un des agents cités précédemment (Stéhelin *et al.*, 1976).

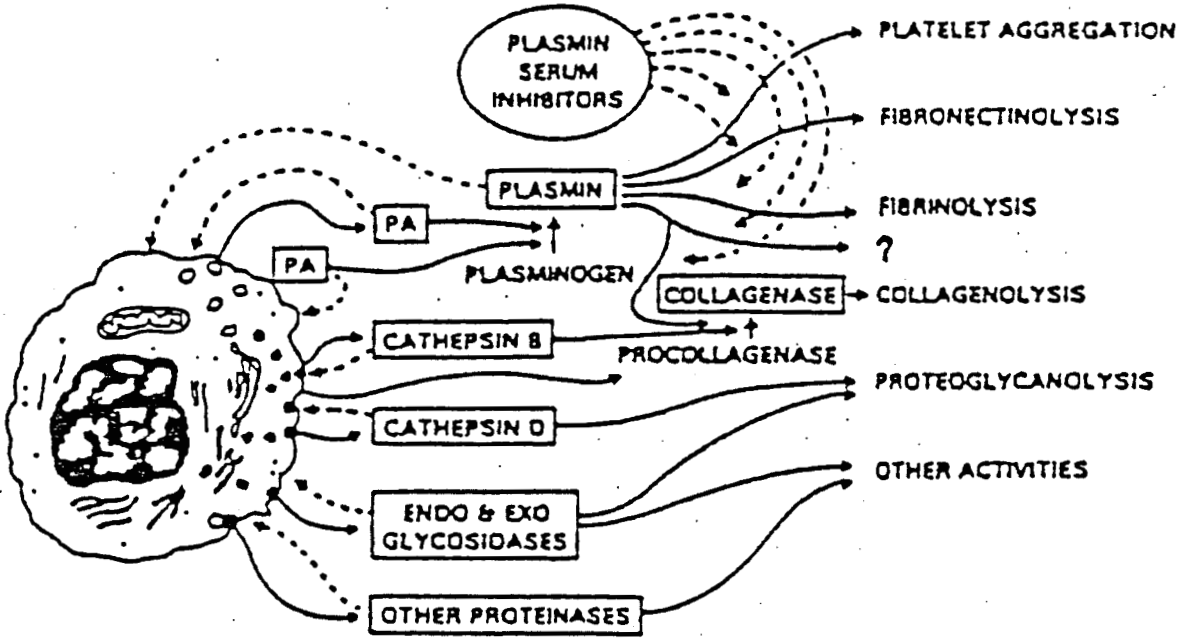
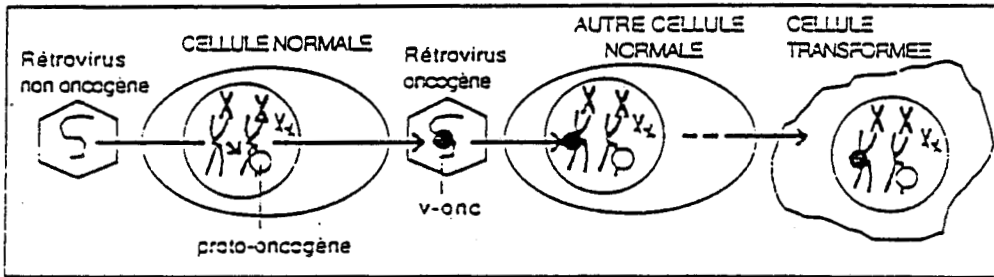


Figure 1: Des enzymes dégradatives présentes à la surface de la cellule maligne ou sécrétées dans le milieu environnant, pourraient jouer un rôle important dans le processus de la mise en place de la métastase. L'effet direct de ces enzymes est représenté par **—————** ; les mécanismes d'autolyse et de feedback négatifs sont représentés par **-----**.



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

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

II - VIRUS ONCOGENES - ONCOGENES

Depuis quelques années, les connaissances sur les mécanismes qui gouvernent la prolifération et la différenciation cellulaire, mécanismes dont le dérèglement aboutit à la transformation cellulaire, ont énormément progressé. Ceci grâce, principalement, à l'étude des oncogènes viraux et à l'identification de leurs analogues cellulaires, les proto-oncogènes cellulaires. C'est au début du siècle que l'on soupçonna l'existence d'agents biologiques pathogènes filtrables et transmissibles, appelés virus (virus à ARN et virus à ADN), capables d'induire la transformation cellulaire. C'est Rous qui, en 1910, ouvrit le chapitre de l'histoire des virus à oncogènes par la découverte d'un virus chez le Poulet : c'est le virus de sarcome de Rous (RSV).

A - Oncogènes

L'étude et la description des oncogènes commença en 1965. C'est à partir de virus à ADN tel que le virus du polyome, que l'on a pu mettre en évidence l'existence de "gènes du cancer". Fried, en 1965, a démontré que la mutation de ce virus affectait ses capacités tumorigènes dans des cellules en culture. C'est un peu plus tard en 1970 que Martin, travaillant sur les rétrovirus, montra pour la première fois, en 1970, que le RSV contenait une fonction requise pour maintenir l'état transformé de la cellule.

Dominique Stéhelin, en 1976, dans le laboratoire de Bishop et Varmus, a pu montrer que les v-onc dérivait de gènes normaux cellulaires, les c-onc ou proto-oncogènes cellulaires, par recombinaison du génome viral avec le génome de la cellule hôte au cours de l'infection par un rétrovirus (Fig. 2 page 14).

Il devenait donc possible à l'aide des v-oncs utilisés comme sonde, de mettre en évidence au sein de cellules eucaryotes des gènes contrôlant les mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaires. En outre, ces v-oncs pouvaient permettre une approche simple d'un modèle d'action normale des c-oncs.

Ces rétrovirus portant des gènes du cancer ont pu être caractérisés à partir de modèles animaux et ils se sont avérés être des outils intéressants pour l'étude des gènes impliqués dans le processus de l'oncogenèse. C'est sur cette base que des chercheurs ont cherché à savoir si des oncogènes étaient impliqués dans les cancers humains déjà caractérisés en cytogénétique et présentant des

modifications chromosomiques (caractéristiques évidentes liées à la transformation dans certains cancers).

Depuis longtemps des maladies dues à des translocations chromosomiques telles que le lymphome de Burkitt (translocation 8/14) et la leucémie myéloïde chronique (translocation 9/22) ont pu être caractérisées par visualisation en cytogénétique des anomalies chromosomiques par cytogénétique. Par les mêmes méthodes des zones d'ADN amplifiées dans les tumeurs ont été caractérisées (HSR pour Homogenously Stained Region et DM pour Double Minute : mini chromosomes).

Dans certains cas de remaniements chromosomiques ou d'amplifications, on a pu associer la modification cytogénétique et l'activation d'un oncogène. C'est le cas, par exemple du lymphome de Burkitt et de la translocation 8/14 où le gène *c-myc* situé normalement sur le chromosome 8 est placé sous le contrôle de régions régulatrices du chromosome 14 qui ne sont pas les siennes. Ceci conduit à une sur-expression du gène qui, additionné à d'autres facteurs dont l'infection chronique par le virus d'Epstein-Barr, conduit au développement du lymphome (Croce, 1987). Ces cas sont relativement rares et bien d'autres types de cancer ne montrant aucune modification chromosomique évidente en cytogénétique devaient être étudiés. C'est avec cet objectif que de nombreuses équipes ont cherché à développer une autre méthode d'approche permettant de détecter des oncogènes activés au niveau de cancers humains pour lesquels rien d'évident n'était visible en cytogénétique. Ils ont donc été amenés à mettre au point des tests de détection dits : test 3T3.

1 - Stratégie d'isolement des oncogènes par le test 3T3

La stratégie consiste à rechercher des gènes activés capables de transformer une lignée fibroblastique de Souris (NIH 3T3) en introduisant par transfection des fragments d'ADN provenant de cellules transformées ou de tumeurs humaines. La transfection réalisée par co-précipitation au phosphate de calcium (Graham et Van Der Erb, 1973). La méthode consiste à mélanger de l'ADN à un tampon phosphate faiblement concentré, et à ajouter du CaCl_2 : il y a alors formation d'un précipité de phosphate de calcium où l'ADN co-précipite. Lorsque les cellules sont mises en présence de ce précipité, elles absorbent l'ADN. L'équipe de Cooper, en 1979, a utilisé les NIH 3T3, particulièrement efficaces pour l'absorption de l'ADN, en les transfectant par de l'ADN de RSV (Coperland *et al.*, 1979). Les cellules forment alors des foyers de cellules morphologiquement transformées (Fig.3 page 17). Par ailleurs, le groupe Wigler en 1979 a montré que des cellules de Mammifères pouvaient être co-transfectées avec un gène eucaryote non-transformant (celui de la β -globine, par exemple) et un marqueur de sélection tel que le gène de résistance à la néomycine (Wigler *et al.*, 1979). Ainsi les cellules transfectées sont sélectionnées sur un milieu contenant cet antibiotique. L'analyse des cellules transfectées résistantes au milieu de sélection montre qu'elles contiennent, intégrées dans leur génome, un assez grand nombre de copies du gène étudié. Les sites d'intégration sont multiples, non spécifiques et disséminés dans le

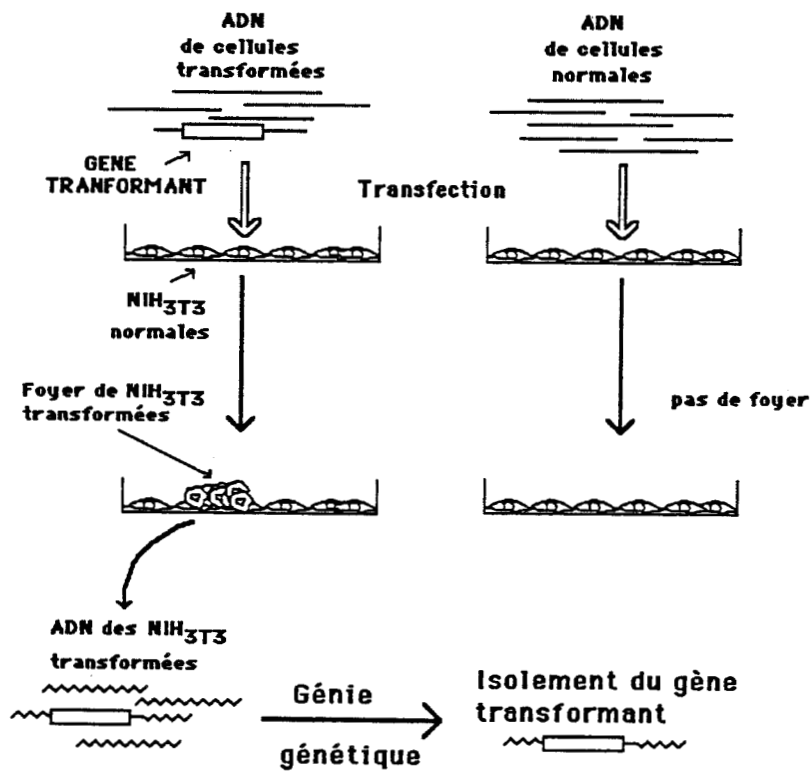


Figure 3: Isolement par le test NIH 3T3 de c-onc activés.

génomique. Dans le cas de la transfection de l'ADN provenant de cellules humaines, l'analyse de l'ADN des cellules transfectées est facilitée par l'utilisation de sondes spécifiques des séquences répétitives *alu* (Jelinek *et al.*, 1980) qui permettent de séparer les séquences humaines transformantes au sein du génome de Souris.

Ce test a permis de révéler que les gènes activés dans de très nombreux cancers humains sont des membres de la famille *ras* : c-Ha-*ras*, c-Ki-*ras* ou N-*ras*. Ce dernier gène n'a pas d'équivalent viral connu et son existence a été révélée par le test 3T3, par transfection d'ADN de lignées de fibrosarcomes et de rhabdomyosarcomes (Marshall, 1982; Hall *et al.*, 1983). La plupart du temps, les gènes *ras* sont activés par mutation ; N-*ras* est activé par amplification dans certains cas (Fasano *et al.*, 1984).

Cependant, cette technique ne permet pas de détecter tous les oncogènes. A ce titre, le groupe de Wigler (Fasano *et al.*, 1984), en utilisant la technique de co-transfection, a mis au point un test de tumorigénicité chez la Souris athymique qui permet de détecter des gènes n'induisant pas forcément de changements phénotypiques des NIH 3T3, mais provoquant toujours la formation de tumeurs.

Après co-transfection de l'ADN étudié et d'un marqueur de sélection (rapport 100/1), puis sélection, les cellules résistantes sont injectées de manière sous-cutanée à des Souris athymiques (environnement favorable au développement de la tumeur) (Fig.4 page 19). La sensibilité du test 3T3 est ainsi accrue, puisque des gènes non identifiables par le test classique sont mis en évidence de cette façon.

2 - Activation d'un oncogène cellulaire

Les oncogènes cellulaires peuvent être activés de deux façons :

- soit le produit du gène est affecté au niveau d'une fonction importante, comme c'est le cas de l'oncogène c-*ras* qui, pour les mutations ponctuelles sur les codons 12, 13 ou 61 (fig.5, page 19) (Santos *et al.* 1982, Taparowsky *et al.*, 1983) voit son activité GTPasique normale fortement diminuée. Ceci laisse la molécule sous une forme active, c'est à dire liée au GTP. Son maintien anormalement long sous cette forme, conduit à la dérégulation de la croissance cellulaire.
- soit le produit de l'oncogène est normal, mais présent en plus grande quantité, comme dans l'exemple type du gène c-*myc* Martin *et al.*, 1986, ont pu montrer que le gène c-*myc* humain placé derrière un promoteur fort comme un LTR (Long Terminal Repeat) viral suffisait à transformer des fibroblastes embryonnaires de Caille.

Dans la plupart des cas, les deux formes d'activation peuvent être présentes. C'est le cas pour l'activation du proto-oncogène *erbB*.

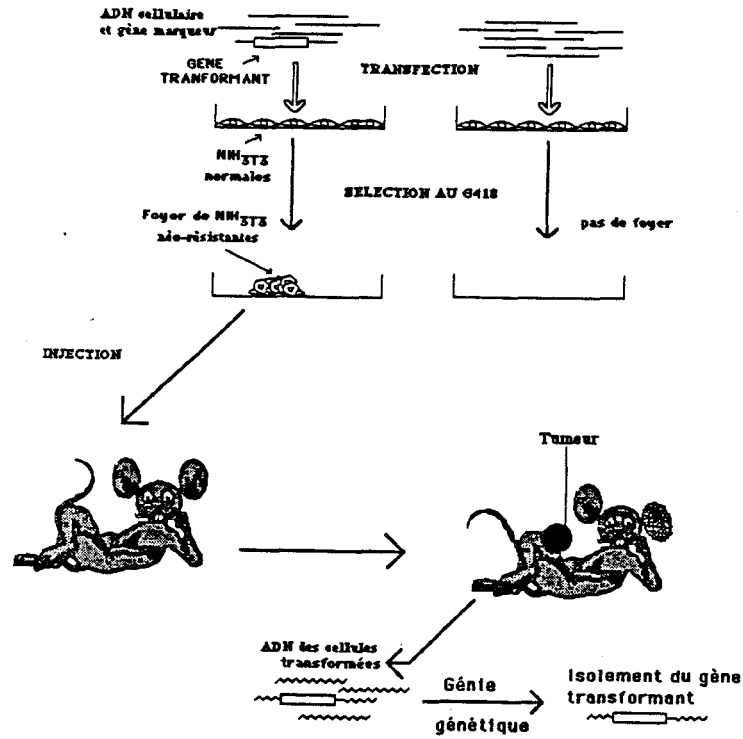


Figure 4: Isolement par le test de tumorigénicité de c-onc activés.

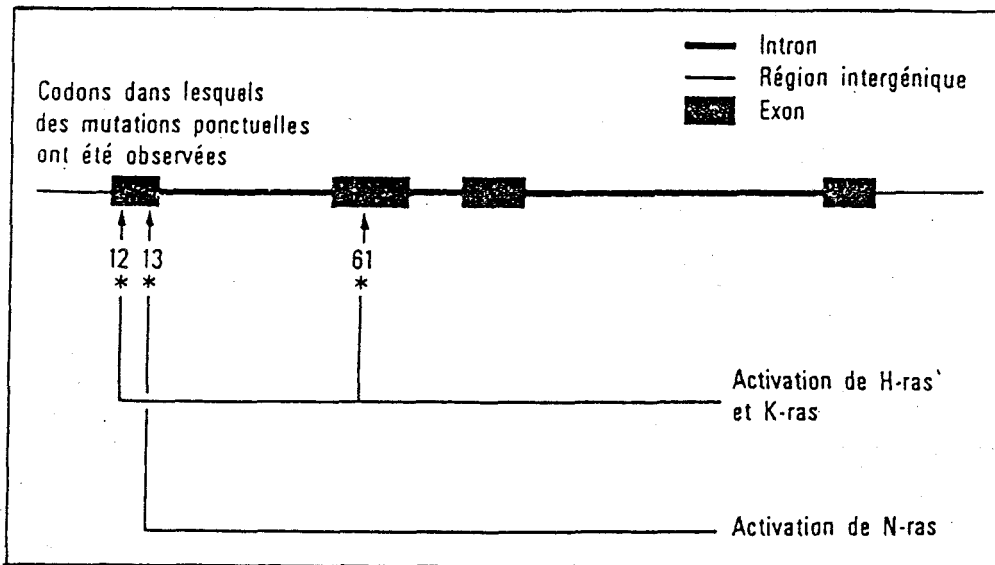


Figure 5: Activation de gènes de la famille de ras par mutation ponctuelle (voir revue de Loucheux, 1987).

3 - Implication des oncogènes dans le métabolisme cellulaire

L'une des caractéristiques évidentes des cellules transformées est de présenter un pouvoir mitogène accru par rapport aux cellules normales. Ainsi on a pu attribuer aux oncogènes des rôles perturbateurs dans le déroulement de la division cellulaire.

Les oncogènes ont pu être divisés en plusieurs classes fonctionnelles. Ces classes recourent toutes les étapes qui assurent le passage du signal extra-cellulaire, fourni par exemple par un facteur de croissance, jusqu'à l'activation de gènes effecteurs responsables de la progression de la cellule à travers les différentes phases de son cycle. La cascade d'événements conduisant à la mitose et dans laquelle interviendraient les produits des oncogènes est schématisée par la figure 6 (page 21).

Les oncogènes sont classés selon leur fonction :

a- Facteurs de croissance

C'est en 1983 que l'on démontra pour la première fois qu'un oncogène pouvait coder pour une molécule impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire : l'oncogène *v-sis*, porté par le virus sarcomateux du Singe (SSV) est responsable de cancers variés chez cet animal. La protéine codée par *c-sis*, proto-oncogène correspondant, n'est autre que le fragment de la chaîne β du facteur de croissance PDGF (Hunter, 1987). La cellule produisant cet homologue du facteur de croissance du PDGF va s'autostimuler (boucle autocrine).

b-Récepteurs de facteurs de croissance

Le facteur de croissance, en se fixant sur le récepteur membranaire, forme un complexe ligand-récepteur activant une protéine kinase associée à ce récepteur. Certains oncogènes peuvent également coder pour des récepteurs de facteurs de croissance ; par exemple, l'oncogène *v-erbB* du virus aviaire AEV code pour une version tronquée et constitutivement fonctionnelle du récepteur de l'EGF (Downward *et al.*, 1984). Ce récepteur possède une activité tyrosine kinase constitutive et il réagit en permanence comme si le facteur de croissance était présent et, de ce fait, stimule en continu la cellule (Revue dans Ullrich et Schlessinger, 1990).

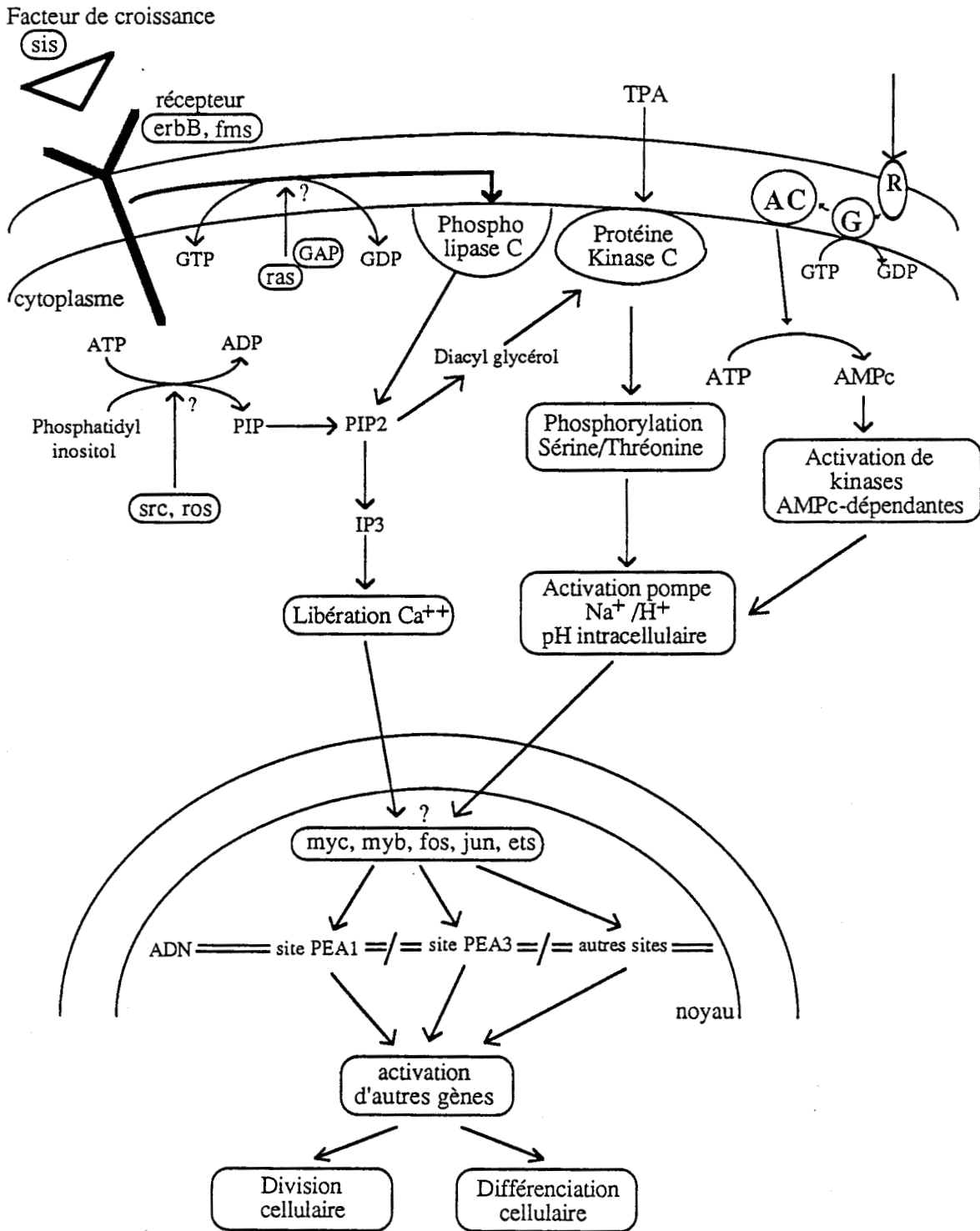


Figure 6: La cascade des oncogènes (D'après Goustin et al. 1986).

(AC: Adénylate cyclase; G : Protéines G; R : récepteur)

c - Effecteurs cytoplasmiques ou seconds messagers

Une fois le récepteur du facteur de croissance activé, le signal mitotique doit "voyager" du cytoplasme vers le noyau, par le biais de seconds messagers. Plusieurs mécanismes distincts peuvent intervenir dans la voie de transduction. Ces mécanismes induisent généralement la phosphorylation de protéines, ce qui permet de moduler leur activité de façon rapide et réversible. Ces réactions de phosphorylation sont catalysées par des protéines kinases spécifiques des résidus tyrosine (*v-src*) ou de sérine et de thréonine (*v-mil/raf*). Par ailleurs, Stern *et al.*, en 1988, ont démontré que la transformation cellulaire s'accompagnait d'une augmentation globale du nombre de protéines phosphorylées par l'activation de la protéine p185^{neu} codée par le proto-oncogène *c-neu*.

- Voie des **phosphatidyl-inositols (PI)** : La stimulation d'un récepteur à tyrosine kinase par son ligand conduit à l'activation de la phospholipase C membranaire qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP₂) en libérant de l'inositol-tri-phosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). Ce dernier active la protéine kinase C (une sérine/thréonine kinase) qui phosphoryle certaines protéines et notamment une pompe Na⁺/H⁺ contribuant à augmenter le pH intra-cellulaire.

L'IP₃ qui diffuse dans le cytoplasme va activer des canaux calciques conduisant à la libération du calcium intracellulaire.

Certains oncogènes à activité kinase peuvent interférer au niveau de cette voie. C'est par exemple, le cas du gène *c-src* qui code pour une protéine de 60 Da à activité tyrosine kinase. Cette protéine est liée à la face interne de la membrane par une ancre lipidique. Elle jouerait un rôle au niveau de la voie des phospho-inositides.

- Voie de l'**adénylate cyclase** : Il existe un autre système de seconds messagers conduisant à la production de l'AMPc.

L'adénylate cyclase, sous le contrôle d'un système complexe de protéines G, pourra être activée et, dans ce cas, hydrolyser l'ATP en AMPc. Les protéines G sont elles-même activées par des récepteurs membranaires n'ayant pas d'activité kinasique (par exemple le récepteur de l'acétylcholine). L'AMPc va activer la protéine kinase A (PKA) qui à son tour va phosphoryler des enzymes susceptibles d'activer des canaux ioniques.

Il existe une homologie de séquence entre la sous-unités α des protéines G et les protéines des proto-oncogènes de la famille *ras*. Elles sont ancrées dans la membrane et ont une activité GTPasique à la seule différence que la p21^{ras}, activée du fait de sa mutation, voit son activité GTPasique diminuer considérablement. Cette protéine serait donc impliquée à plusieurs niveaux dans les voies de transduction de seconds messagers. Leur mécanisme d'action n'est pas encore bien défini. Une étude plus approfondie des oncogènes *ras* est réalisée plus loin.

d - Facteurs de transcription

La régulation de l'expression des gènes s'effectue grâce à l'interaction de facteurs régulateurs agissant de façon positive (activateurs) ou négative (inhibiteurs) avec de multiples éléments ou séquences de l'ADN (promoteurs et/ou enhancers) généralement localisés en 5' des séquences codantes. Ces facteurs de transcription appartiennent à un réseau de protéines nucléaires dont l'expression conjointe ou successive permet la reprogrammation de l'expression génétique en réponse à des signaux extracellulaires, par le biais des seconds messagers vu précédemment.

Les protéines nucléaires de type récepteur intracellulaire (c-erbA, récepteur aux hormones thyroïdiennes) ou agissant de manière indépendante d'un ligand sont capables de moduler directement ou indirectement la transcription d'autres gènes susceptibles de contrôler la division et/ou la différenciation cellulaire. Ainsi, les produits des oncogènes v-fos et v-jun s'associent en un complexe qui se fixe spécifiquement sur une séquence nucléotidique de reconnaissance (site AP-1/PEA-1) (Chiu *et al.*, 1988) présente dans le promoteur de gènes cibles. De même, les produits des oncogènes de la famille ets reconnaissent les sites PEA3 situés en amont de nombreux gènes comme celui de la collogénase (Imler *et al.*, 1988; Wasylyk *et al.*, 1990). Quelques oncogènes impliqués dans les voies décrites précédemment sont représentés dans le Tableau 1 (page 24).

B - Coopération d'oncogènes

Des études expérimentales *in vivo* ont pu montrer que la carcinogenèse était l'aboutissement de plusieurs étapes consécutives. L'initiation, phénomène irréversible affectant un élément clé du génome cellulaire, rend la cellule suffisamment "anormale" pour qu'elle puisse répondre à un deuxième agent carcinogène (le promoteur) et progresser vers la malignité.

1 - in vitro

De nombreux chercheurs ont tenté de mettre en évidence l'implication des oncogènes dans le processus de la transformation cellulaire *in vitro*.

Rassoulzadegan *et al.*, en 1982, dans l'équipe de Cuzin, ont démontré l'importance des trois gènes portés par la région codante précoce du virus du polyome dans la cancérogenèse multi-étapes de fibroblastes de Rat. Dans le même domaine, Land *et al.* dans l'équipe de Weinberg, ont montré, en 1983, la possibilité de transformer des cellules primaires de fibroblastes de Rat par coopération des oncogènes myc et ras. Ce modèle a été affiné grâce aux observations faites par Spandidos et Wilkie en 1984, montrant que l'environnement cellulaire était très important lors de la transformation. Dans le même ordre d'idée, Land *et al.*, en 1986, ont démontré que la capacité d'un oncogène à

Tableau I : Localisation des produits de quelques proto-oncogènes dans la cellule

Localisation des produits	Nature du proto-oncogène	Caractéristiques des produits
Externe	<i>sis</i>	Homologie avec un facteur de croissance (chaîne β du PDGF)
Membrane cytoplasmique (transmembranaire)	<i>erb-B</i> <i>fms</i> <i>ros</i>	Homologie avec un récepteur de facteur de croissance - récepteur de l'EGF - récepteur du CSF-1 - homologie avec le récepteur de l'insuline
Membrane cytoplasmique (face interne)	<i>src</i> <i>yes</i> <i>fes/fps</i> <i>ras</i>	Activité tyrosine-kinase Activité GTPasique (homologie avec les protéines G)
Cytoplasme	<i>mill/raf</i> <i>mos</i>	Activité sérine/thréonine-kinase
Nucléaire	<i>myc</i> <i>myb</i> <i>fos</i> <i>jun</i> <i>ets</i> <i>rel</i> <i>erb-A</i>	Activateurs géniques ? myb-box site AP-1/PEA-1 site AP-1/PEA-1 site PEA-3 ? Récepteur des hormones thyroïdiennes

transformer une cellule dépendait du taux de son expression, mais aussi des conditions de milieu de culture, confirmant de ce fait les observations de Spandidos. Les cellules normales seraient donc capables d'inhiber fortement la prolifération des cellules transfectées.

Ces observations sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cellules à confluence sécrèteraient dans le milieu des substances inhibitrices de la croissance cellulaire (Resnitzky *et al.*, 1986 ; La Rocca *et al.*, 1989).

L'oncogène ras (oncogène cytoplasmique) serait capable d'induire une modification de la morphologie cellulaire, il permet à la cellule de pousser en agar, mais il n'aurait aucun rôle sur l'immortalisation, alors que myc (oncogène nucléaire) est capable d'immortaliser la cellule sans induire les modifications caractéristiques induites par ras (Bignami *et al.*, 1988).

Dans la nature, il existe des virus à deux oncogènes qui sont des modèles précieux de coopération. Par exemple, Bechade *et al.* en 1985 ont utilisé le rétrovirus oncogène aviaire MH2 (Mill Hill 2) qui comporte dans son génome les oncogènes v-myc et v-mil. Ce virus est capable de transformer des cellules de rétine de Poulet (CNR). On a pu démontrer que v-mil intervenait dans l'induction de la prolifération des cellules, alors que myc transforme ces cellules déjà "immortalisées". Cette coopération est nécessaire pour transformer les macrophages aviaires *in vitro* : alors que mil intervient dans la prolifération, myc permet leur croissance sans adjonction de cMGF (Chicken Myelomonocytic Growth Factor) (Graf *et al.*, 1986). En contre-partie, Casalbore *et al.* en 1987 démontraient que v-myc suffisait pour transformer les cellules CNR cultivées dans un milieu très riche. Une fois de plus, ces résultats contribuent à démontrer que le milieu environnant joue un rôle important dans le pouvoir transformant d'un oncogène, les milieux très riches étant plus favorables au développement du phénotype transformé.

Tous les modèles de coopération d'oncogènes, impliquent généralement la coopération d'un oncogène immortalisant et d'un oncogène transformant (Weinberg, 1985). Dans le cas décrit par Amouyel *et al.* (1989), deux oncogènes nucléaires peuvent aussi induire une transformation cellulaire des CNR.

2 - in vivo

Depuis ces travaux, des chercheurs ont essayé de montrer *in vivo* l'importance de ces mécanismes dans le développement des cancers. L'utilisation de Souris transgéniques constitue un des moyens les plus courants pour réaliser ce genre d'étude.

Pour pouvoir étudier l'impact d'un oncogène dans un tissu *in vivo*, il est nécessaire de placer ce gène dans un contexte favorable à son expression. Le choix du promoteur est primordial. Celui d'un

gène fortement exprimé dans le tissu cible pourra être greffé à l'oncogène étudié. Ce gène hybride sera ensuite inoculé à des cellules embryonnaires, lesquelles seront réimplantées chez des Souris, dans l'objectif de les rendre transgéniques. Cette technique a permis récemment de mieux comprendre l'effet des oncogènes seuls ou en coopération dans un environnement cellulaire plus approprié, et de mieux cerner leur implication dans la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que la cancérogenèse.

Quaife *et al.* en 1987, ont montré qu'un oncogène c-Ha-ras activé et contrôlé par le promoteur du gène de l'élastase I introduit chez des Souris transgéniques est suffisant pour conduire à la transformation rapide des cellules foetales pancréatiques, contrairement à myc qui n'a aucun effet dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans la plupart des lymphomes de Burkitt, on a montré que le gène myc se trouvait, par suite d'une translocation chromosomique, sur les chaînes lourdes d'immunoglobulines. Dans le cadre de cette étude, des chercheurs ont mis en évidence *in vivo* que l'expression constitutive de l'oncogène c-myc sous le contrôle de ce promoteur (E μ -myc) suffisait à induire la prolifération des cellules lymphoïdes B et les prédispose à la lymphogénèse, et, d'autre-part, qu'il augmentait considérablement l'impact des oncogènes v-Ha-ras et v-raf dans la transformation des cellules lymphoïdes B. De même, l'analyse *in vitro* des lymphomes induits par E μ -myc révèle l'apparition de mutations spontanées des gènes N-ras et Ki-ras sur le codon 61. Ceci pourrait bien expliquer une des voies de progression de la lymphogénèse (Langdon *et al.*, 1988; Alexander *et al.*, 1989a ; 1989b).

C- Les anti-oncogènes

On a longtemps pensé que la transformation maligne était un caractère dominant par rapport au phénotype normal. En effet, des expériences *in vitro* d'hybridation cellulaire entre des cellules malignes et des cellules normales produisaient souvent des hybrides transformés. Des chercheurs ont tenté de sélectionner des souches de cellules normales qui, après hybridation avec les cellules transformées, produisent des hybrides à phénotype normal. Ils ont de même observé que le caractère non transformé persiste tant que certains chromosomes restent présents. Après plusieurs passages, la disparition de certains chromosomes confère à la cellule le phénotype transformé (Klein G., 1987).

Ces données suggéraient l'existence de gènes suppresseurs du phénotype cancéreux. La disparition d'un gène indispensable à l'inhibition de la croissance cellulaire pourrait induire une croissance anormale de la cellule. C'est depuis l'identification du gène de susceptibilité au rétinoblastome humain, nommé gène Rb, et de sa protéine, que l'hypothèse de l'existence des anti-oncogènes a été démontrée. Le rétinoblastome affectant les cellules souches des cônes rétiniens est une maladie très rare (5,6 cas/100 000). Cette maladie est héréditaire et ne touche que les enfants (Harel, 1989).

L'analyse de ces cellules a permis de caractériser la disparition d'un fragment sur le bras long du chromosome 13 (13q14). La caractérisation du gène Rb s'avérait très difficile. C'est grâce aux travaux de plusieurs équipes et notamment de celle de Weinberg qu'il fut possible de cloner le gène Rb (Friend *et al.*, 1986 ; Lee *et al.*, 1987). L'étude de sa protéine a montré qu'elle était nucléaire et serait susceptible d'être phosphorylée par des enzymes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire (Friend *et al.*, 1987 ; Lee *et al.*, 1987).

Depuis la découverte de Rb, on a retrouvé dans cette famille un gène jusqu'ici connu comme oncogène : le gène de la p53. Finlay *et al.*, en 1989, ont mis en évidence une activité anti-oncogène dominante de la p53, malgré les nombreuses discussions faites à son sujet. En effet, la p53, protéine nucléaire, a la particularité de se fixer à de nombreuses protéines cellulaires. On a montré que la p53 se trouvait fréquemment inactivée dans de nombreux cancers humains, par exemple le carcinome du colon (Baker *et al.*, 1990). Elle se trouve généralement en grande quantité dans les cellules transformées, immortalise la cellule et coopère avec ras dans la transformation, ce qui lui a valu le titre d'"oncogène". Une fois mutée, elle est toujours présente mais inactive dans la cellule, et cette absence, est responsable du phénotype transformé ce qui en fait également un anti-oncogène. Depuis, un autre anti-oncogène, K-rev, a été caractérisé. Il appartient à la famille des gènes ras (Kitayama *et al.*, 1989). Des travaux récents ont montré qu'il pouvait inhiber l'action de la p21^{ras} (Frech *et al.*, 1990) et cette inhibition reposerait sur l'existence d'une homologie de séquence entre les deux protéines, ceci au niveau de la région effectrice de la p21^{ras} (Zhang *et al.*, 1990). Il est clair que oncogènes et anti-oncogènes jouent un rôle important dans les différents systèmes de régulation de la croissance cellulaire.

D - L'oncogène ras

1 - Présentation

Les oncogènes ras furent d'abord identifiés dans les souches Harvey (Ha) et Kirsten (Ki) des virus de sarcome de Rat, deux virus à haut pouvoir transformant engendrés par la transduction des deux proto-oncogènes cellulaires Ha-ras et Ki-ras (Barbacid, 1987). La protéine oncogène produite par ces virus est une protéine de 21 kDa appelée p21^{ras}. Le "test 3T3" (voir page 13) a permis de mettre en évidence l'existence d'oncogènes cellulaires ras activés c-Ha-ras, Ki-ras et N-ras au niveau de nombreuses tumeurs humaines (Santos *et al.*, 1982 ; Parada *et al.*, 1982 ; Hall *et al.*, 1983), et notamment pour l'oncogène Ki-ras au niveau de tumeurs colorectales (Der et Cooper, 1983 ; Mc Coy *et al.*, 1983 ; Forrester *et al.*, 1987 ; Bos *et al.*, 1987). L'étude de ces oncogènes ras a révélé que leur activation provenait de mutations ponctuelles au niveau des codons 12, 13 ou 61 (Reddy *et al.*, 1982 ; Tabin *et al.*, 1982 ; Bos *et al.*, 1985 ; Bos *et al.*, 1987). Dans d'autres cas plus

restreints, cette activation peut s'accompagner d'une mutation du dernier intron qui serait responsable de l'augmentation de la capacité transformante de l'oncogène c-Ha-ras (Cohen et Levinson, 1988). La troncature de l'exon-1 non codant de c-Ha-ras peut produire le même effet (Cichutek et Duesberg, 1986).

Par ailleurs, les oncogènes ras cellulaires semblent être particulièrement "sensibles" aux agents carcinogènes ; ainsi des expériences menées chez des Mammifères à qui l'on induisait des carcinomes par des agents carcinogènes chimiques, montrent que, dans la plupart des cas, des gènes ras sont activés (Balmain *et al.*, 1983 ; Balmain *et al.*, 1984). Des expériences menées *in vitro*, montrent que des cellules immortalisées peuvent être transformées par différents oncogènes ras activés par mutation, ou encore que ras peut agir en coopération avec d'autres oncogènes pour transformer des cellules primaires (Land *et al.*, 1983 ; Ruley, 1983 ; Newbold, 1983).

2 - La protéine p21^{ras}

Les protéines N, Ha et Ki p21^{ras} sont membres d'une grande famille de petites protéines se liant au GTP/GDP : la famille des protéines G. Les p21^{ras} présentent une grande homologie structurale et fonctionnelle avec les sous-unités α des protéines G.

Les protéines ras ont une localisation sous-membranaire. Elles sont fixées à la membrane par l'intermédiaire d'un groupement farnésyl qui sert "d'ancre lipidique" et qui est fixé à ras par sa partie C-terminale (CAAX box). Une localisation correcte dans la membrane est nécessaire pour assurer l'activité fonctionnelle des protéines ras. Des mutations de la région CAAX box de la partie C-terminale de la protéine affectant la cystéine inhibe son activité, la polyisoprénylation ne pouvant plus se faire. Dans certains cas, le ciblage spécifique membranaire implique l'addition d'un groupement supplémentaire palmityl sur une autre cystéine (181 ou 184), ceci pour Ha-ras et N-ras, mais pas pour Ki-ras (Hancock *et al.*, 1989).

Comme les protéines G, les p21^{ras} sont actives associées au GTP et inactives associées au GDP. L'hydrolyse du GTP se fait par l'action GTPasique de la protéine (Lacal *et al.*, 1984 ; Mc Grath *et al.*, 1984). La p21^{ras} mutée sur les codons 12,13 ou 61 montre une diminution de son activité GTPasique avec persistance du complexe actif p21^{ras}-GTP. Cette forme active lors de la transduction d'un signal transmembranaire n'est que transitoire et son maintien anormalement long est responsable de la dérégulation des signaux impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire.

Le mécanisme d'action de la p21^{ras} n'est pas encore bien connu. Les travaux menés dans un premier temps chez la Levure *Saccharomyces cerevisiae*, avaient montré que la p21^{ras} induisait une activation de l'adénylate cyclase (Barbacid, 1987). Mais ceci n'a pas été démontré chez les cellules de Mammifères (Beckner *et al.*, 1985). Elle agirait donc à un autre niveau dans la cellule, ce qui

permet de relativiser la notion de conservation du gène ras au cours de l'Evolution étant donné que cette protéine aurait une action différente dans la Levure et dans la cellule de Mammifère.

La micro-injection de p21^{ras} dans des oocytes de Xénopes induit leur maturation (Birchmeier *et al.*, 1985) et, d'autre part, stimule la production de diacylglycérol ainsi que d'autres intermédiaires métaboliques de la voie des phospho-inositides (Lacal *et al.*, 1987). Elle induit également de cette façon une augmentation du pH intracellulaire chez des fibroblastes de Souris NIH 3T3 (Hagag *et al.*, 1987). De même, la transformation des NIH par ras s'accompagne d'une augmentation de l'activité choline kinase (Macara, 1989). Donc, tout porte à croire que la p21^{ras} est impliquée dans la voie des phospho-inositides (Berridge *et al.*, 1984 ; Fleishman *et al.*, 1986 ; Urumow et Wieland, 1990), système ubiquitaire qui semble jouer un rôle clé dans diverses fonctions cellulaires.

La famille des protéines ras pourrait toutefois intervenir comme relais dans l'activation de récepteurs membranaires, mais aussi au niveau de modifications structurales du cytosquelette : Cette hypothèse pourrait expliquer leur efficacité dans la transduction de signaux par une réorganisation spatiale des éléments de transduction (Hanley et Jackson, 1987).

3 - Mécanisme d'action de ras

L'importance de l'oncogène ras dans la régulation des signaux de transduction intracellulaire a depuis longtemps été mis en évidence mais son mécanisme d'action biochimique reste actuellement obscur.

De nombreuses voies de signaux de transduction peuvent être bloquées par la micro-injection d'anticorps neutralisant ras dans les cellules au niveau de cellules quiescentes stimulées par différents facteurs de croissance. Ras pourrait bien être une molécule régulatrice permettant une liaison entre les récepteurs de facteurs de croissance et les voies de signaux de transduction connues. Un des moyens de cerner son mécanisme d'action est d'identifier à la fois les facteurs activateurs impliqués en amont et en aval de la p21^{ras}. La régulation de la protéine ras peut essentiellement se faire en amont (échanges de nucléotides GTP/GDP) ou en aval lors de l'hydrolyse du GTP (fig. 7 page 30).

a - Signaux en amont

Le taux de libération de guanine nucléotides des protéines ras est extrêmement faible. Ceci a permis de supposer l'existence d'un effecteur permettant d'accélérer la libération du GDP et, de ce fait, de favoriser l'échange GDP/GTP. Ce facteur a été isolé à partir du cytosol de cerveau de Rat. Cette protéine ras-GRF (ras-guanosine releasing factor) pourrait bien être impliquée dans l'activation de la protéine ras (Hoshino *et al.*, 1988).

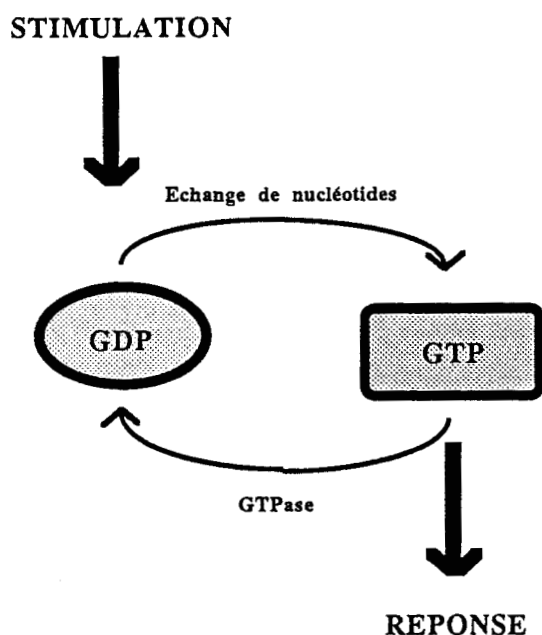


Figure 7: Mécanisme de base de la régulation des protéines se liant au GTP/GDP.

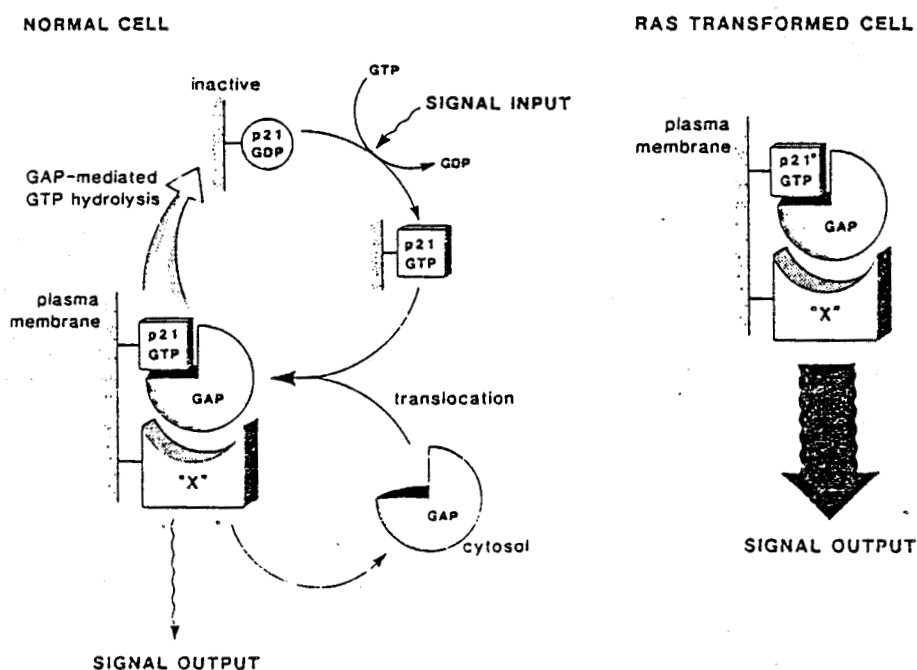


Figure 8: La GAP pourrait bien être un effecteur et un régulateur de la protéine ras. Le modèle de gauche décrit la GAP interagissant avec une protéine ras normale et celui de droite, avec une protéine ras mutée sur les codons 12, 59 et 61 générant un signal incontrôlé (Mc Cormick, 1990).

b - Signaux en aval

Des travaux récents ont montré l'existence d'une protéine activatrice de la p21^{ras} et des protéines G appelée GAP (Guanosine Triphosphatase Activating Protein). C'est une protéine de 120 kDa liée à la membrane. Elle agirait au niveau d'un site effecteur de la protéine p21^{ras} (Sigal *et al.*, 1986). On a longtemps attribué à la p21^{ras} une activité GTPasique intrinsèque mais, depuis la caractérisation de la GAP, il est clair actuellement que la GAP est un effecteur de la p21^{ras} et active la conversion du GTP-p21 en GDP-p21 (Trahey *et al.*, 1988). En effet, la p21^{ras} isolée et purifiée montre une activité GTPasique très faible qui, en présence de la GAP, est considérablement augmentée (jusqu'à 100 fois son activité GTPasique intrinsèque). Par ailleurs, elle n'a aucun effet sur les oncoprotéines dont les mutations sont en 12, 59 et 61 (site de liaison au GTP), pour lesquelles l'activité GTPasique intrinsèque semble affectée par ces mutations. Ces mutations seraient susceptibles d'induire une modification conformationnelle de la protéine empêchant l'activité hydrolytique du GTP, mais n'empêcheraient pas la fixation de la GAP à la p21^{ras} sur un site effecteur. Ce site serait localisé dans la région située entre les résidus acides aminés 32 et 40 (Sigal, 1988 ; Adari *et al.*, 1988). Des études cristallographiques de la protéine ras ont apporté des informations sur la topologie de cette dernière (De Vos *et al.*, 1988 ; Pai *et al.*, 1989). Le site de reconnaissance de la GAP serait effectivement la région codée entre Tyr 32 et Tyr 40 et plus précisément au niveau de Thr 35 (Jurnak *et al.*, 1990). Des mutations à ce niveau inhibent l'interaction de la protéine ras et la GAP.

La GAP agirait en aval de la p21^{ras} (fig.8 page 30), viendrait se fixer sur la p21^{ras}-GTP et catalyserait la réaction de conversion en GDP, mécanisme conduisant à la transmission d'un signal sous-jacent dans la voie de transduction.

Récemment, Yatani *et al.*, en 1990, travaillant à partir de membranes isolées, ont pu montrer en examinant le contrôle des canaux potassiques par les protéines G après l'activation d'un récepteur muscarinique, que l'addition de GAP recombinante avec ras bloquent rapidement le courant à travers les canaux activés. L'effet de l'addition de la GAP recombinante est dépendante de la présence de ras endogène dans la membrane. De même, un ras recombinant nécessite la présence de la GAP endogène pour permettre ce phénomène. Ce complexe GAP-ras pourrait bien servir d'inhibiteur du complexe formé par les sous-unités de la protéine G et notamment de l'association des sous-unités β, γ et de la sous-unité α .

Par ailleurs, on sait que la GAP est phosphorylée sur un résidu tyrosine en réponse à l'action de l'EGF ou du PDGF (mais pas de l'insuline). Après phosphorylation, la GAP est très fortement associée avec le récepteur du PDGF. Actuellement nous savons que ce récepteur se lie et phosphoryle au moins 4 protéines en réponse à sa stimulation : la phospholipase C (PLC), c-raf, la PI₃ kinase et la GAP présenté Fig.9 (page 33) (Hall, 1990a). La délétion de 83 acides aminés de la région montrée en sombre sur le schéma inhibe la transmission du signal mitotique et bloque la

liaison de la GAP ainsi que la PI₃ kinase. Ceci qui impliquerait que ces 2 protéines sont nécessaires à la transmission du signal mitotique et que la GAP peut recevoir directement un signal du récepteur activé. Que devient alors ras dans cette hypothèse ? GAP est-elle ou non un effecteur de l'activité de ras ? Ces questions n'ont pas encore reçu de réponse (Mc Cormick, 1989a; 1989b).

4 - Les familles ras

De nombreux travaux ont montré que l'expression de ces gènes est très importante au niveau des tissus foetaux et embryonnaires, alors qu'elle diminue considérablement dans les tissus adultes (Müller *et al.*, 1982).

Depuis la découverte des proto-oncogènes c-Ha-ras, c-Ki-ras et N-ras, de nouveaux gènes ont été identifiés sur la base de leur homologie à ras (ral, R-ras, rho, rab, rap1 et rap2) montrant 30 à 60 % d'homologie avec les protéines ras (Chardin et Tavitian, 1986 ; Lowe *et al.*, 1987 ; Madaule et Axel, 1985 ; Touchot *et al.*, 1987 ; Pizon *et al.*, 1988). Ces protéines interviennent dans de nombreuses voies métaboliques mais leurs fonctions restent encore incertaines. On peut toutefois noter que les protéines présentant une homologie de 60 % avec les protéines ras comportant la CAAX box sont impliquées dans les voies de transduction. Par exemple, la surexpression de rap1A induit une réversion du phénotype transformé de cellules transfectées par ras, par le fait que rap1A entre en compétition avec ras vis-à-vis de la GAP. Les protéines présentant moins d'homologie comme par exemple rho, seraient présentes dans l'appareil de Golgi et le cytoplasme et joueraient un rôle au niveau de l'organisation du cytosquelette du fait de leur action sur la stabilité des réseaux d'actine (Fig.10 page 34 ; Hall, 1990b).

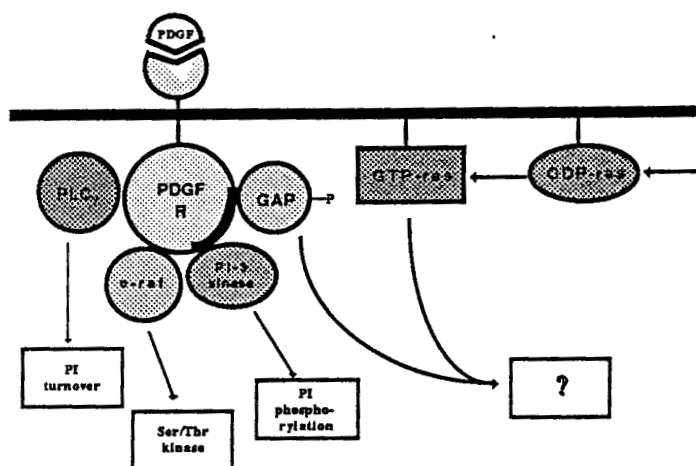


Figure 9: La stimulation du récepteur du PDGF conduit à la phosphorylation de nombreuses protéines conduisant à une variété de signaux intracytoplasmiques (Hall, 1990).

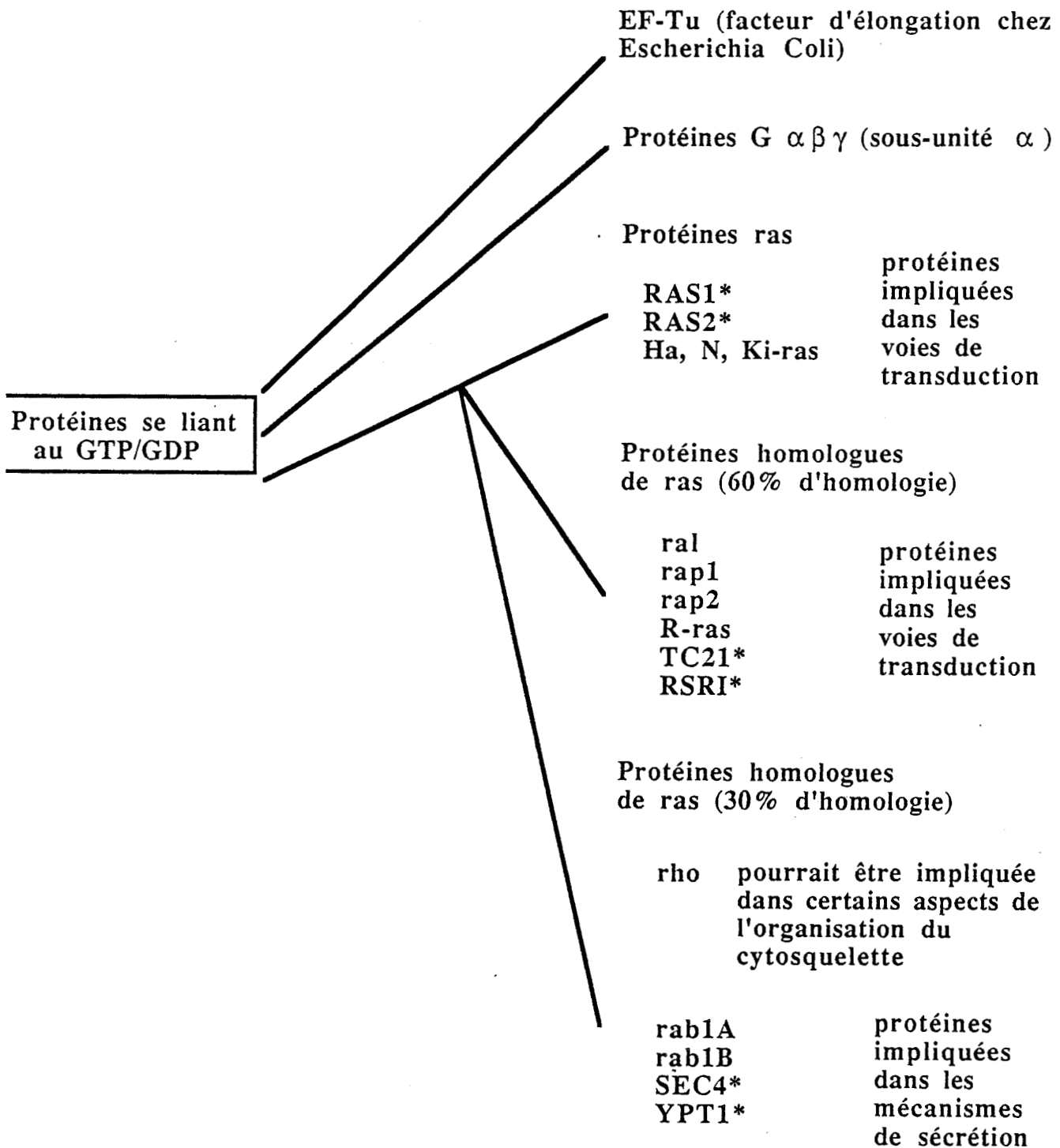


Figure 10: Famille de protéines se liant au GTP/GDP (Hall, 1990)

* chez la levure

III - GLYCOCONJUGUES CELLULAIRES

Boyd et Renkonen, au début du siècle, ont mis en évidence l'existence d'agglutinines végétales, que l'on appellera plus tard lectines, capables d'agglutiner de manière spécifique et réversible, des cellules sanguines (Boyd et Reguera, 1949 ; Renkonen, 1948 ; Boyd, 1954). En corrélation, Watkins et Graham démontraient en 1952 que les déterminants antigéniques des groupes ABH reconnus par les lectines étaient de nature oligosaccharidique (voir revue générale de Sharon et Lis, 1987). Nowell, en 1960, montra que la lectine de Haricot (PHA) était capable d'induire la transformation blastique des lymphocytes. Aub, au début des années 60 (Aub *et al.*, 1963 ; 1965 ; 1965a) montra, pour la première fois, que la transformation cellulaire affectait la glycosylation de la surface cellulaire, ceci par des lectines (WGA et ConA), révélant une modification de l'agglutinabilité des cellules malignes comparativement aux cellules normales. Morell, en 1971, mit en évidence l'existence de lectines membranaires (Morell *et al.*, 1971). C'est un peu plus tard, grâce au développement des méthodes analytiques, qu'une multitude de structures oligosaccharidiques furent décrites (Montreuil, 1980 ; 1982 ; 1984a ; 1984b ; 1987 ; Hakomori, 1983 ; Kobata, 1984 ; 1987).

A - Structure

1 - Les constituants

Les glycoconjugués sont des molécules lipidiques ou protéiques associées à une partie oligosaccharidique, le glycanne, pour constituer soit un glycolipide, soit une glycoprotéine. Les structures glycanniques sont élaborées par l'action de glycosyltransférases spécifiques. Elles sont localisées dans le reticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Les monosaccharides majeurs sont au nombre de sept : D-glucose (Glc), D-mannose (Man), D-galactose (Gal), L-fucose (Fuc), N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), et différents acides sialiques dont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac). Ces derniers présentent une grande hétérogénéité en fonction des différentes possibilités de substitution sur leurs fonctions hydroxyliques (Schauer, 1985). On rencontre aussi des monosaccharides mineurs tels que l'arabinose (Ara), le xylose (Xyl) ...

Tous les travaux réalisés en biochimie des glycanes ont permis de progresser très rapidement dans la détermination des structures et dans l'étude de leur biosynthèse. Par contre, leurs fonctions biologiques restent un domaine encore peu connu.

L'exemple simple de l'incompatibilité sanguine reposant sur la présence d'antigènes de structures

glycanniques contribue à démontrer clairement l'importance de l'information biologique portée par ces structures. Les oligosaccharides sont des candidats très intéressants pour la transmission de l'information biologique du fait du nombre important de structures oligosaccharidiques pouvant dériver à partir d'un nombre restreint de monosaccharides, comparativement à un même nombre d'acides aminés ou d'acides nucléiques. De plus, des modifications spécifiques avec l'addition d'autres groupes fonctionnels, tels que des groupements sulfates et phosphates viennent augmenter leur diversification. L'information biologique détenue par ces structures est contrôlée de manière stricte lors de leur biosynthèse (Gabijs, 1987a).

Il est actuellement établi que la glycosylation se fait sur des séquences peptidiques bien déterminées appelées séquons (Marshall et Neuberger, 1968). Par exemple, pour la N-glycosylation, la séquence reconnue est le Asn-X-Ser(Thr) où X est un acide aminé quelconque à l'exception de la Proline. A cette première condition vient s'ajouter la conformation spatiale de la séquence peptidique ; seules les structures en β -turn possédant le séquon sont glycosylées. Ces observations sont corrélées avec le fait que la glycosylation est toujours localisée à la surface de la protéine. Leur position est de ce fait privilégiée dans les systèmes d'interaction et de reconnaissance. Les glycannes pourraient, en effet, jouer un rôle dans la protection des protéines (contre les attaques protéolytiques) et pourraient aussi expliquer la faible immunogénicité souvent observée des protéines glycosylées par un masquage de sites peptidiques (voir la revue de Montreuil, 1984a). On rencontre deux types de liaisons glycanniques dans les glycoprotéines : les liaisons de type O-glycosidique et celles de type N-glycosidique, conduisant à les classer en O-glycosylprotéines, N-glycosylprotéines et N,O-glycosylprotéines (pour une classification complète, voir la revue de Montreuil 1975).

2 - Les O-glycosylprotéines

Les O-glycosylprotéines résultent d'une liaison O-glycosidique entre la portion glycannique et des résidus de sérine ou de thréonine (le plus souvent) de la protéine. Elles sont membranaires ou sériques (hormones, facteurs de coagulation, immunoglobulines, protéines anti-gel de Poisson des mers froides). Ces structures peuvent être linéaires ou branchées. Les protéoglycannes des matrices extra-cellulaires sont également considérées comme des O-glycosylprotéines. Ces macromolécules sont formées par l'enchaînement de motifs répétés disaccharidiques, sulfatés ou phosphorylés, qui s'associent à une protéine, elle même reliée à l'acide hyaluronique par l'intermédiaire d'une protéine de liaison.

La biosynthèse des O-glycannes fait intervenir des glycosyltransférases hautement spécifiques, ne faisant pas intervenir d'intermédiaire glycolipidique comme dans le cas des N-glycosylprotéines. Elles seraient localisées au niveau du reticulum endoplasmique lisse et au niveau de l'appareil de

Golgi.

Les mucines constituent une famille de protéines très riches en liaison de type O-glycosidiques.

Quatre noyaux peuvent être distingués dans les O-glycannes de mucines (Carlson 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 complexes des O-glycannes.

Quelques exemples de ce type de structures sont données dans la figure 11 (page 38) (voir la revue de Montreuil, 1984a).

La sialylation des glycannes de mucines peut se faire soit en α -2,6 sur les résidus GalNAc, soit en α -2,3 sur les résidus de GalNAc et de Gal, soit en α -2,4 sur les résidus de Gal(β -1,3) en position terminale non réductrice.

Nous savons actuellement peu de choses sur la conformation spatiale des O-glycannes, à l'exception des mucines sous-maxillaires. Les mucines ont un rapport axial élevé et ont une structure droite s'expliquant par une répulsion de charges électro-négatives portées par les résidus acides sialiques. En effet, les mucines sont très riches en acides sialiques. Ce type de conformation est responsable de la haute viscosité des mucines. L'élimination des résidus acides sialiques confère à la mucine une structure globulaire qui perd de ce fait sa viscosité initiale. Cet exemple illustre clairement le rôle des glycannes dans le maintien de sa conformation biologiquement active (Gottschalk, 1981).

3 - Les N-Glycosylprotéines

Tous les glycannes des N-glycosyl protéines possèdent une structure pentasaccharidique commune : le mannotrioso-di-N-acétylchitobiose lié à un résidu d'asparagine de la protéine par l'intermédiaire du résidu de GlcNac situé en position terminale réductrice.

La substitution de ce noyau pentasaccharidique par les monosaccharides majeurs cités précédemment conduit à trois grandes classes de glycannes (Montreuil, 1975) (Fig.12 page 39) :

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

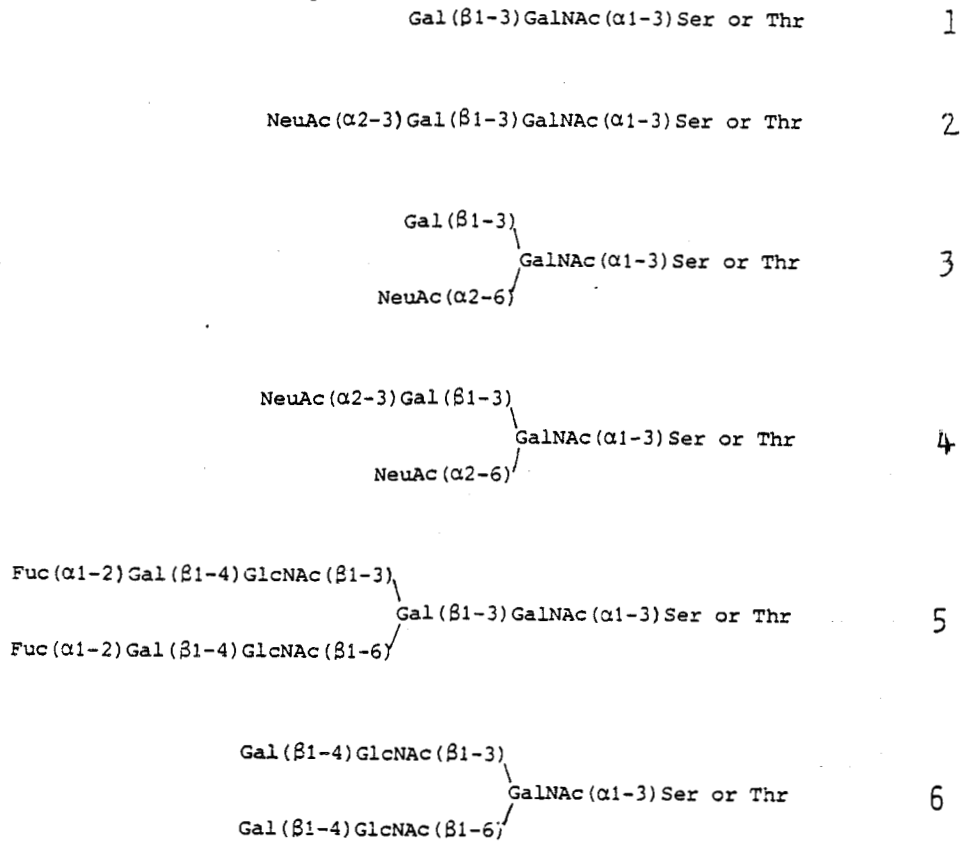


Figure 11: Quelques exemples de structures glycaniques liés O-glycosidiquement à la protéine par une liaison GalNAc(α 1-3) Ser (ou Thr) trouvées dans les glycoprotéines membranaires.

- 1: Epiglycanine des cellules TA3-Ha, glycoprotéine de cerveau de Rat.
- 2: Glycophorine humaine, groupe sanguin N.
- 3: Glycoprotéine de cerveau de Rat.
- 4: Glycophorine humaine, groupe sanguin M.
- 5: Groupe sanguin H de Porc.

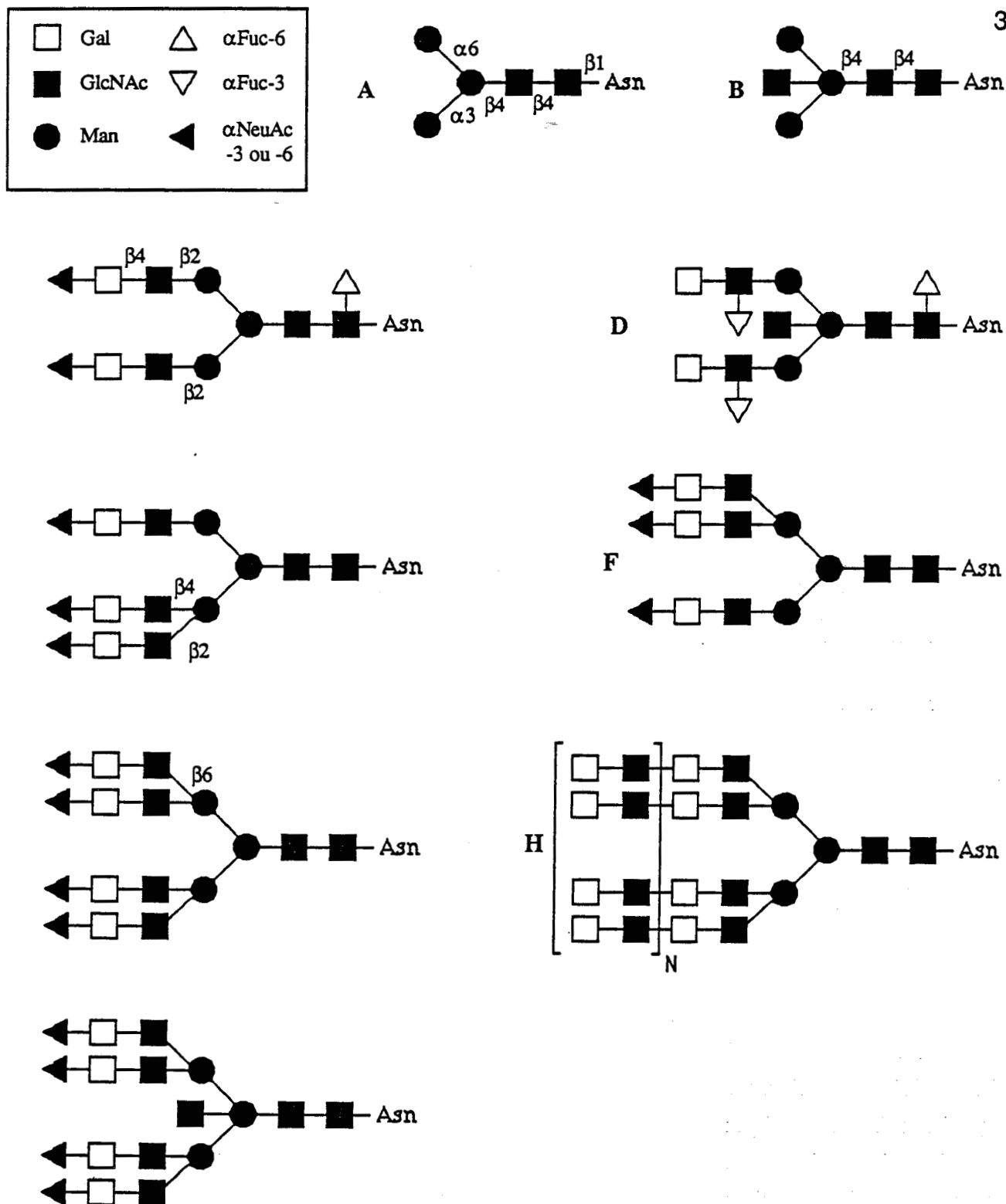


Figure 12 : Variabilité des structures glycaniques liées à l'asparagine. Représentation schématique de structures N-acétyllactosaminiques biantennées (C, D) ; triantennées (E, F) ; tétraantennées (G, H, I). Le noyau invariable des glycanes liés à l'asparagine est représenté sans (A) et avec (B) un résidu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

A l'exception des structures oligomannosidiques qui ne sont jamais sialylées, la sialylation de ces structures oligosaccharidiques s'effectue généralement en position terminale non réductrice de la chaîne oligosaccharidique, l'acide sialique étant lié par une liaison α -2,6 ou α -2,3 au galactose terminal (Fig.12 page 39).

L'acide sialique peut être lié par une liaison α -2,8 sur un autre résidu d'acide sialique formant ainsi des oligomères linéaires de longueur variable. Ces structures ont été caractérisées dans les glycoprotéines membranaires NCAM (nervous cell adhesion molecules), molécules impliquées dans l'adhésion des cellules nerveuses (Finne et Makela, 1985) ainsi que dans des bactéries telles que *Escherichia coli*. Enfin, Fukuda a caractérisé la présence de disialoside Neu5Ac(α -2,9)Neu5Ac en position terminale des structures poly-N-acétyllactosaminiques des cellules de carcinome embryonnaire humain (Fukuda *et al.* 1985), structures également présentes chez certaines bactéries.

Les N-glycannes ne sont pas des structures figées, inertes. Au contraire, les études menées sur leur conformation spatiale ont montré qu'elles pouvaient adopter des conformations diverses et interchangeables. Nous allons développer ces différentes propriétés dans le chapitre suivant.

B - Conformation des N-Glycannes

L'étude de la conformation spatiale des N-glycannes fut d'abord basée sur l'utilisation des modèles moléculaires. C'est grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques (Rayon X, RMN, RPE...) que la conformation spatiale a pu être affinée (voir la revue de Montreuil, 1984a).

1 - Conformation spatiale des N-glycannes

La conformation spatiale de la structure bi-antennée des glycannes de la sérotransferrine fut très étudiée. On lui attribua d'abord une conformation Y, sur la base des études menées à partir de modèles moléculaires. Elle est représentée par une structure rigide *inv* (invariable) composée d'un pentasaccharide mannotriosido-di-N-acetylchitobiose, où le trisaccharide Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N) est plat et rigide, structure maintenue par des liaisons hydrogènes. A cette dernière sont associées des structures mobiles *var* (variable) appelées antennes constituées de trisaccharides NeuAc(α /2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2).

C'est un peu plus tard, sur la base de nombreuses études, que la conformation spatiale Y fut affinée. En effet, d'autres conformations possibles ont été décrites :

- La conformation T, où l'antenne α 1,3 est disposée perpendiculairement à l'antenne α 1,6.
- La conformation en "oiseau", où l'antenne α 1,6 montre une grande rotation autour de la liaison

glycosidique.

- La conformation en "aile brisée" où l'antenne $\alpha 1,6$ est retournée vers la protéine. Cette dernière serait favorable aux structures bi-antennées portant un résidu de GlcNAc "intercalaire".

En ce qui concerne les structures plus complexes, telles que les structures tétra-antennées, leur conformation spatiale est représentée sous forme de "parapluie" du fait d'une répulsion des antennes par les charges électro-négatives portées par les acides sialiques (fig.13 page 42).

2 - Implications de la conformation spatiale dans le comportement biologique des glycannes

L'étude de la conformation spatiale des N-glycannes a fourni de nombreuses informations permettant d'apporter des arguments en ce qui concerne le rôle et l'importance des glycannes dans les interactions lectines/glycannes, leur accessibilité aux enzymes impliquées dans leur biosynthèse, mais aussi, dans les phénomènes de masquage de la protéine. C'est ce dernier point que nous allons particulièrement développer.

La taille des N-glycannes permet un recouvrement non négligeable de la protéine. Un glycanne tétraantenné en conformation spatiale "parapluie" peut, en effet, recouvrir 20-25 nm². Ainsi l' $\alpha 1$ -glycoprotéine acide ou orosomucoïde (MM : 37000 kDa), comportant 5 glycannes essentiellement de type tri- et tétra-antennés, est complètement enveloppée par ces structures. Cette organisation spatiale pourrait expliquer la résistance et la faible antigénicité de cette protéine. La présence des acides sialiques est importante dans ce cas, car elle est indispensable pour maintenir la conformation "parapluie", grâce aux forces de répulsions induites par leurs charges électro-négatives. L'élimination des acides sialiques confère aux antennes une grande mobilité annulant la protection de la protéine qui devient de ce fait antigénique et plus sensible aux protéases. Par ailleurs, ce "masquage" pourrait conférer aux cellules métastatiques la possibilité d'échapper au système immunitaire car l'on sait que les glycoprotéines membranaires des cellules transformées sont enrichies en structures tri- et tétra-antennées (Warren *et al.*, 1978). De plus, les structures glycaniques portées par les cellules métastatiques pourraient expliquer leur localisation spécifique (ciblage) par des interactions avec des lectines membranaires des cellules du tissu hôte.

L'étude de la conformation spatiale des N-glycannes permet donc de mieux appréhender le rôle de ces structures en temps que signaux de reconnaissance. De plus, le double caractère de rigidité et de flexibilité des glycannes peut jouer un rôle important dans la fonction biologique de la portion glycanique des glycoprotéines.

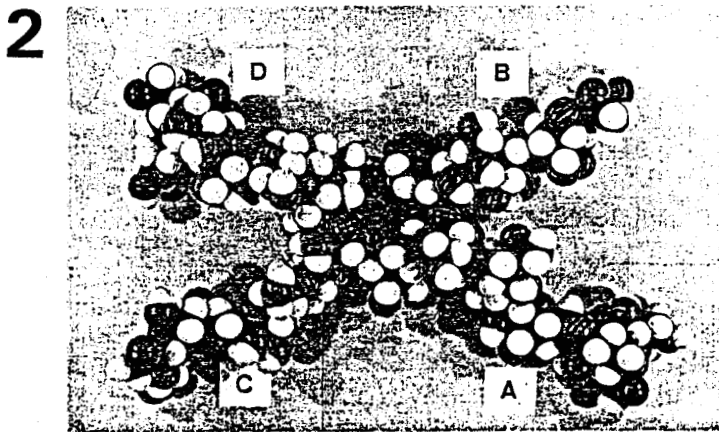
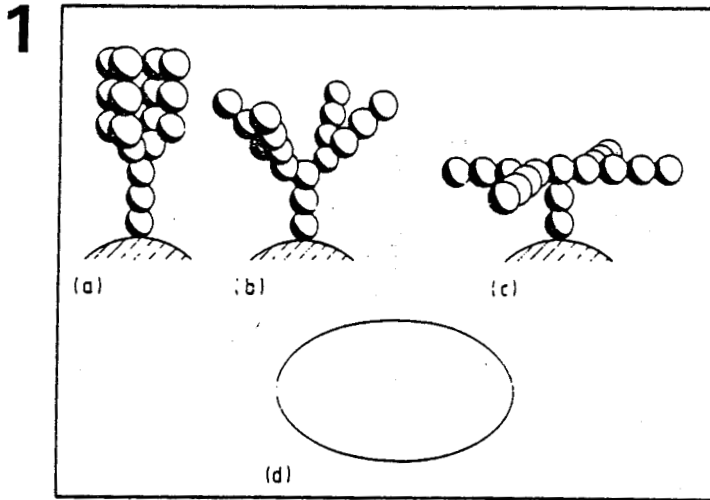


Figure 13: Conformations spatiales d'un glycanne tétra-antenné sialylé, déterminée à partir de la α_1 -glycoprotéine acide humaine (Li *et al.*, 1983). L'ellipse d'une dimension de 5,3 x 3,1 nm correspondant à la protéine est dessinée à l'échelle en (d) (1). Vue aérienne d'un tétra-antenné dans la conformation en "parapluie" (2).

C - Biosynthèse des N-glycosylprotéines

La biosynthèse des N-glycosylprotéines suit un cheminement complexe faisant intervenir plusieurs compartiments cellulaires, des intermédiaires polypréniques, et un équipement de glycosyltransférases spécifiques. Elle est décrite comme étant un phénomène co- puis post-translationnel, impliquant dans un premier temps, à l'intérieur du reticulum endoplasmique rugueux (RER), la formation d'un précurseur glycolipidique et le transfert de la portion glycannique sur la protéine en cours de synthèse. Puis, dans l'appareil de Golgi, ce glycanne subit une dégradation séquentielle par des glycosidases spécifiques, une maturation post-translationnelle par additions successives, séquentielles et spécifiques, des monosaccharides constitutifs de la glycosylation terminale. Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 14 (page 44).

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la modification de la glycosylation des N-glycosylprotéines et, plus particulièrement, de la sialylation de surface, ainsi qu'aux modifications des activités sialyltransférasiques affectant les cellules transformées par différents oncogènes. Dans ce contexte, nous verrons donc plus en détail les activités sialyltransférasiques.

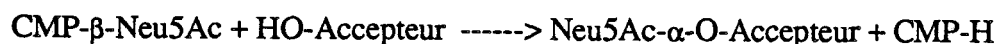
D - Les sialyltransférases

La glycosylation terminale, comme nous l'avons vu précédemment, s'effectue essentiellement dans le trans-Golgi par des glycosyltransférases spécifiques regroupant les principales catégories suivantes :

- Sialyltransférases
- Fucosyltransférases
- Galactosyltransférases

Afin de mieux comprendre la spécificité d'action des glycosyltransférases impliquées dans le mécanisme de la glycosylation terminale *in vivo*, la purification des glycosyltransférases et leur caractérisation ont apporté de nombreuses informations permettant de mieux cerner ce mécanisme. Parmi ces glycosyltransférases, ce sont les sialyltransférases qui ont fait l'objet de notre travail.

Les sialyltransférases constituent une famille de glycosyltransférases qui catalysent à partir du cytidyl-monophosphoneuramininate (CMP- β -Neu5Ac) le transfert de l'acide sialique en position terminale non réductrice sur la fonction hydroxyle de l'accepteur glycannique des glycoprotéines ou des glycolipides.



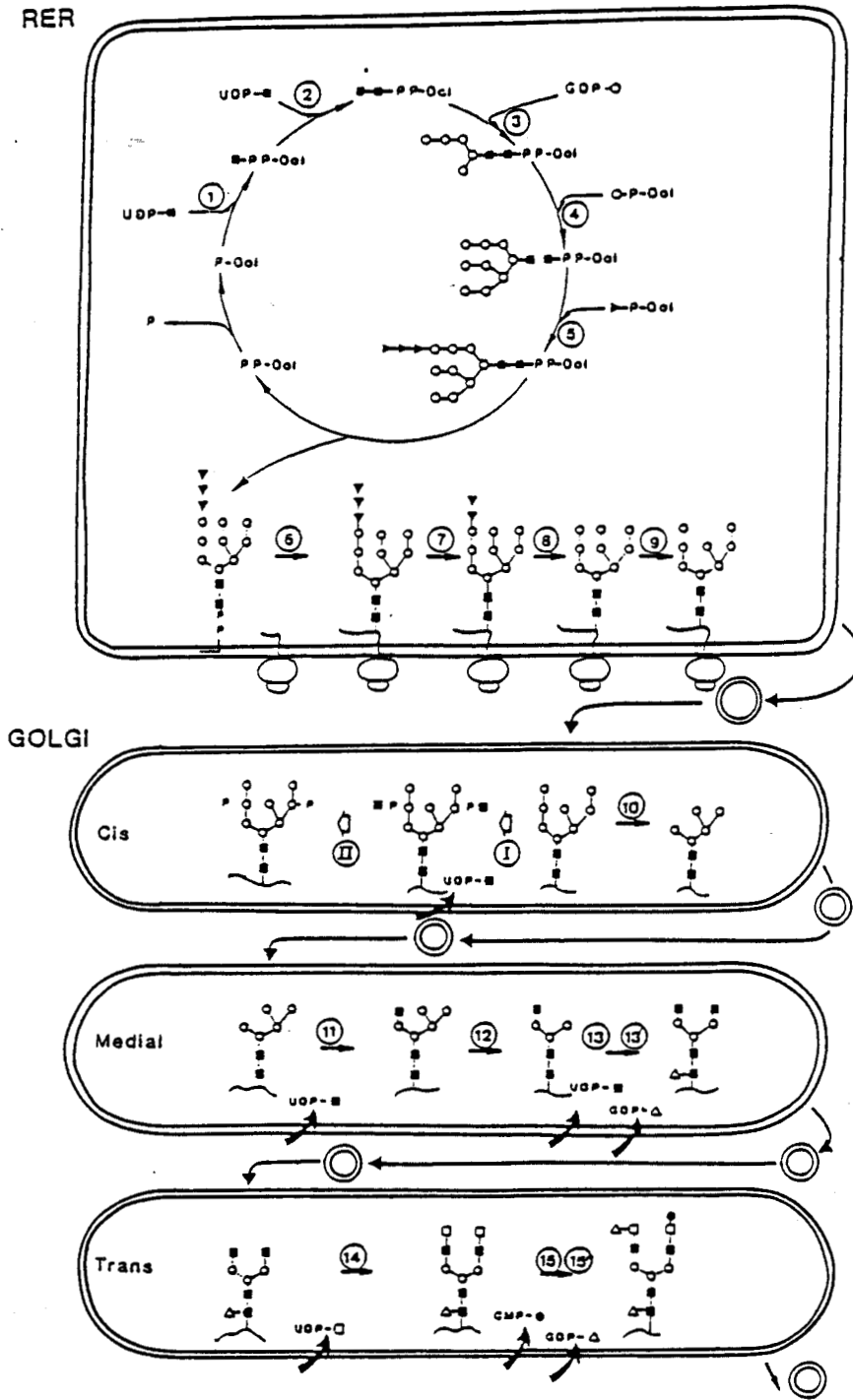


Figure 14: Représentation schématique de la biosynthèse des oligosaccharides dans le réticulum endoplasmique rugueux et du processus de maturation des glycanes N-glycosidiquement liés dans l'appareil de Golgi, d'après Verbert et al., (1987). Les symboles représentent:

■ N-acétylglucosamine; ○ Mannose; ▼ Glucose; □ Galactose; ● Acide sialique.

1 - Localisation

Des études par immunolocalisation ont permis de situer plus précisément les sialyltransférases au niveau du trans-Golgi (Munro *et al.*, 1975 ; Roth *et al.*, 1984 ; 1986 ; Berger et Hesford, 1985; Taajes *et al.*, 1988) et, plus récemment, Trinchera et Ghidoni, en 1989, ont localisé deux glycosphingolipide-sialyltransférases dans des compartiments sub-golgiens différents du foie de Rat.

Certaines glycosyltransférases, en particulier certaines sialyltransférases et fucosyltransférases, ont été décrites en périphérie de la cellule, associées à la membrane plasmique (Cacan *et al.*, 1978). Cependant, ces ecto-enzymes ne représentent qu'une faible proportion de l'ensemble de l'activité cellulaire totale et leur rôle reste à définir. Par ailleurs, des activités sialyltransférales ont été, de même, caractérisées dans des mitochondries.

Les sialyltransférases sont aussi présentes dans le lait, le colostrum et le sang (Bartholomew *et al.*, 1973 ; Paulson *et al.*, 1977 ; Beyer *et al.*, 1981). Le foie constitue la source principale des glycoprotéines circulantes et semble être à l'origine de certaines sialyltransférases sériques ; il a été démontré que les corticoïdes et notamment la dexamétasone, un glucocorticoïde synthétique, augmente l'expression transcriptionnelle de la sialyltransférase ainsi que sa sécrétion par des hépatocytes en culture (Wang *et al.*, 1989).

Finalement, nous ne connaissons encore que peu de choses de ces glycosyltransférases sériques ou présentes dans d'autres compartiments cellulaires que l'appareil de Golgi. Cependant, comme nous le verrons un peu plus loin, les formes solubles des glycosyltransférases pourraient provenir de la membrane après élimination du peptide d'ancrage par une dégradation protéolytique.

2 - Purification et caractérisation

La purification de sialyltransférases à partir d'extraits tissulaires, solubilisées dans des détergents, se fait généralement par chromatographie d'affinité sur CDP-hexanolamine-Agarose (Beyer *et al.*, 1981).

Il existe au moins une dizaine de sialyltransférases différentes si l'on s'en tient aux structures sialyl-oligosaccharidiques connues. Chacune d'entre elles se distingue enzymatiquement par sa spécificité pour la séquence de l'accepteur oligosaccharidique et pour le type de liaison formé entre l'acide sialique et le monosaccharide accepteur (Beyer *et al.*, 1981) :

- Neu5Ac(α 2-6)Gal
- Neu5Ac(α 2-3)Gal
- Neu5Ac(α 2-4)GlcNAc
- Neu5Ac(α 2-6)GalNAc
- Neu5Ac(α 2-4)Gal

Leurs activités ont depuis longtemps été caractérisées et étudiées (Bartholomew *et al.*, 1973 ; Carlson *et al.*, 1973a ; 1973b ; Rearick *et al.*, 1979 ; Sadler *et al.*, 1979 ; Joziasse *et al.*, 1985 ; Weinstein *et al.*, 1982...). Les sialyltransférases se trouvent en faible quantité dans les tissus, ce qui rend difficile les étapes de purification. Actuellement seules quelques unes ont pu être purifiées (voir tableau II page 47).

Paulson *et al.*, en 1978, démontraient par l'utilisation de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase purifiée à partir de colostrum de Vache (Paulson *et al.*, 1977a ; 1977b) et de la N-acétylglucosamine-fucosyltransférase purifiée à partir du lait de Femme (Beyer *et al.*, 1981), que la glycosylation terminale de l'asialosérototransferrine peut être, soit sialylée pour former le Neu5Ac α -2,6Gal β -1,4GlcNAc, soit fucosylée et donner la structure Gal β -1,4 (Fuc α -1,3)GlcNAc, mais jamais les deux ; ces deux enzymes ont des activités mutuellement exclusives.

La β -galactoside α -2,6-sialyltransférase a été très étudiée, elle fut purifiée et caractérisée très tôt par Paulson *et al.* (1977a ; 1977b ; 1978) à partir de colostrum de Vache, et à partir de foie de Poulet (Bendiak et Cook, 1982 ; 1983) à partir de foie de Rat (Weinstein *et al.*, 1982). Actuellement c'est la seule sialyltransférase clonée. Sa caractérisation a montré la haute spécificité de cette enzyme pour son substrat. En effet, elle utilise comme accepteur glycanique des structures de type N-Acétyllactosaminique exclusivement pour donner des structures Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc. Bendiak et Cook (1983) ont montré que pour la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase extraite de foie de Poulet, son meilleur accepteur était l'asialo-orosomucoïde (comparativement à des glycoprotéines portant soit des O- et N-glycannes, soit des O-glycannes).

Les études de la même enzyme extraite à partir du colostrum et menées par Paulson *et al.* (1978) montraient que son affinité pour ce substrat variait selon le degré de branchement. Ainsi, pour un temps égal de saturation des sites sialylables de l'asialo-sérototransferrine, seuls 50 % des sites sont sialylés sur l'asialo-orosomucoïde. Joziasse *et al.* (1987) ont étudié la spécificité de cette enzyme pour des structures N-acétyllactosaminiques de type bi, tri et tétraantennées et ont pu démontrer que cette enzyme avait une affinité préférentielle pour le galactose porté par la branche 1 avec une plus faible affinité pour la branche 2, puis la 3 ; la 4 étant résistante à toute sialylation en α 2-6 (fig. 15 page 48).

La sialylation des structures de type N-acétyllactosaminique de glycoprotéines sériques ne résulte pas du hasard, la sialylation peut se faire en α 2-6 ou en α 2-3 sur les résidus de galactose, respectant un ordre de priorité de sialylation en α 2-6 sur les résidus galactose des antennes 1 et 2, moins fréquemment de la 3 et quasiment jamais de la 4. L'enzyme reconnaît la structure Man(β 1-4)GlcNAc portée par le N-glycane. La conformation de la branche 1 serait favorable à la fixation de l'enzyme et donc à la sialylation du galactose porté par cette antenne. L'augmentation du nombre d'antennes diminue l'affinité de l'enzyme. L'incorporation d'un deuxième acide sialique se fait plus difficilement du fait d'une modification de la conformation de la structure monosialylée et d'autre part, la charge négative de l'acide sialique pourrait avoir un rôle répulsif.

Tableau II: Quelques exemples de sialyltransférases purifiées.

<u>Structures acceptrices</u>	<u>Liaison formée</u>	<u>Source</u>	<u>Référence</u>
Gal(B1-3/4)GlcNAc-R	$\alpha 2-3$	Foie de Rat	Weinstein <i>et al.</i> 1987
Gal(B1-4)GlcNAc-R	$\alpha 2-6$	Foie de Rat	Miagi <i>et al.</i> 1982
Asialo- $\alpha 1$ -glycoprotéine acide	$\alpha 2-6$	Colostrum de Vache	Paulson <i>et al.</i> 1977
GalNAc-Ser	$\alpha 2-6$	Glandes sous-maxillaires de Porc	Sadler <i>et al.</i> 1979
Asialo-mucine sous-maxillaire ovine	$\alpha 2-6$	Glandes sous-maxillaire de Vache	Higa <i>et al.</i> 1985
Gal(B1-3)GalNAc-Ser	$\alpha 2-3$	Glandes sous-maxillaire de Porc	Sadler <i>et al.</i> 1979

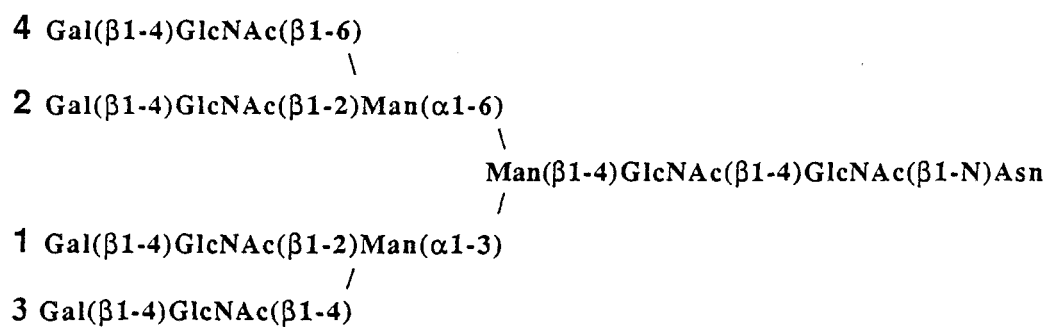


Figure 15: Etude de la spécificité de la β -D-galactoside α -2,6-sialyltransférase pour chaque branche de la structure N-acétyllactosaminique tétra-antennée utilisée comme accepteur (Joziassse *et al.*, 1987).

La sialylation en α 2-3 serait donc fonction de la sialylation en α 2-6 qui serait déterminante dans ce cas. En effet, la β -galactoside α -2,3-sialyltransférase a un spectre d'action plus large et serait moins spécifique que la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase pour ce substrat (Joziassse *et al.*, 1987).

Ces résultats montrent à quel point les sialyltransferases possèdent une haute spécificité d'accepteur.

3 - Séquencage et Clonage

Récemment, la structure primaire de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase de foie de Rat a été déterminée par clonage de l'ADNc correspondant (Weinstein *et al.*, 1987), permettant de clarifier les relations existant entre la forme membranaire et la forme soluble de cette sialyltransférase. En effet, la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase soluble (41 kDa) proviendrait d'une digestion protéolytique de la partie peptidique NH₂-terminale de la forme membranaire comprenant 63 acides-aminés et incluant le domaine de liaison à la membrane. Par ailleurs, des dosages enzymatiques ont pu confirmer qu'après clivage de l'ancrage peptidique, l'enzyme était toujours active. L'enzyme serait alors libérée dans le lumen de l'appareil de Golgi puis excrétée (Weinstein *et al.*, 1987; Colley *et al.*, 1989; voir fig. 16a page 50).

Jusqu'à présent, six glycosyltransferases ont été clonées (Tableau III page 51). Toutes ces enzymes sont impliquées dans la glycosylation terminale des O- et N-glycosylprotéines et des glycolipides.

Elles ont toutes une topologie commune, comprenant, un domaine catalytique important situé dans la région luminale de l'appareil de Golgi, un ancrage peptidique, et, un petit fragment dans la région cytoplasmique. Mais elles n'ont pas d'homologie de séquence entre elles (Fig. 16b page 50). On accepte actuellement que ces glycosyltransferases interagissent sur les mêmes séquences glycaniques de glycoprotéines ou de glycolipides, depuis que l'on a pu observer que certaines de ces enzymes purifiées étaient capables d'utiliser à la fois ces deux accepteurs comme substrat *in vitro* (Paulson *et al.*, 1989b).

4 - Régulation

Les mécanismes de la régulation de la glycosylation terminale des glycoconjugués sont encore peu connus actuellement. Sur la base des études structurales et de la détermination de la structure primaire des glycannes, il est évident que cette glycosylation diffère en fonction du type cellulaire et de l'espèce animale considérée, qu'elle est susceptible de varier en fonction du développement, de la différenciation, ou de l'état physiologique cellulaire. D'autre part elle est modifiée lors de la transformation maligne. Nous savons que la structure de la partie glycanique et par ailleurs, la partie protéique, imposent des contraintes stériques pouvant limiter son accessibilité à la "machinerie" de glycosylation.

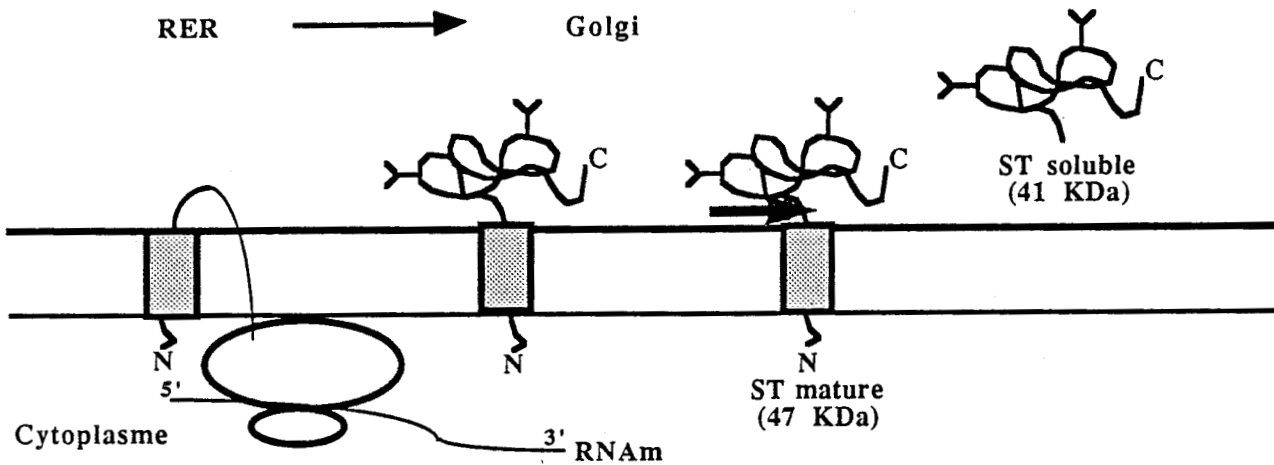


Figure 16a: Représentation schématique de la biosynthèse, de la topologie et des modifications post-traductionnelles de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase (Weinstein *et al.*, 1987).

Enzyme protéolytique golgienne : \rightarrow

N-glycannes : Y

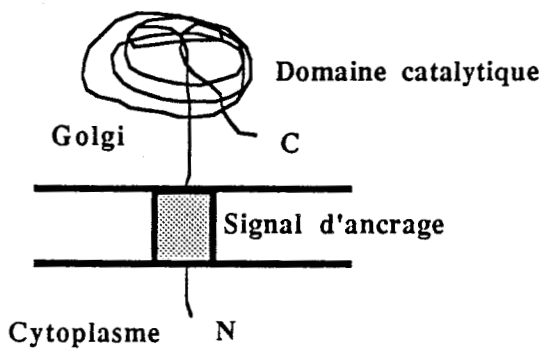


Figure 16b: Topologie commune à toutes les glycosyltransférases terminales clonées. (Paulson *et al.*, 1989).

Tableau III: Glycosyltransférases actuellement clonées.

Glycosyltransférases	Substrat	Source	Référence
Galactosyltransférases (GT)			
GlcNAc(β1-4)GT	UDP-Gal	Gal(β1-4) GlcNAc-R	Shaper <i>et al.</i> , 1988
Gal(α1-3)GT	UDP-Gal	Gal(α1-3)Gal(β1-4)GlcNAc-R	Joziasse <i>et al.</i> , 1989
Sialyltransférase (ST)			
Gal(α2-6)ST	CMP-Neu5Ac	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc-R	Weinstein <i>et al.</i> , 1987
Fucosyltransférases (FT)			
GlcNAc(α1-3)FT	GDP-Fuc	Fuc(α1-3) \ GlcNAc-R / Gal(β1-3/4)	Lowe <i>et al.</i> *
Gal(α1-2)FT	GDP-Fuc	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc-R Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GalNAc-R	Lowe <i>et al.</i> *
N-Acetylgalactosaminyl- transférase	UDP-GalNAc	GalNAc(α1-3) \ Gal-R / Fuc(α1-2)	Yamamoto <i>et al.</i> **
Gal(α1-3)GalNAcT (Transférase du groupe sanguin A)			

* Communication personnelle dans l'article suivant: Paulson *et al.* 1989b

** Soumis pour publication

De plus, la structure protéique peut, par la reconnaissance de déterminants spécifiques, moduler l'activité des glycosyltransférases vis-à-vis d'une protéine ou d'une classe de protéines (Kornfeld et Kornfeld, 1985). La glycosylation terminale peut aussi être le reflet de l'expression des glycosyltransférases dans une cellule ou un tissu donné.

Certains résultats permettent de penser que l'expression différentielle des glycosyltransférases est un facteur essentiel de la régulation de la biosynthèse de ces structures glycaniques. En effet, Paulson *et al.*, en 1989 (1989a), ont pu caractériser de façon claire une modulation dans l'expression de la galactoside α -2,6-sialyltransférase dans des cellules de Rat d'origines tissulaires différentes. Par ailleurs, Lee *et al.*, (1989), ont montré que cette même enzyme transfectée dans des cellules ovariennes de Hamster chinois (CHO), n'exprimant pas cette activité initialement, était bien exprimée, d'une part, et était capable d'induire une modification de la sialylation de la surface membranaire d'autre part. Ce même type d'expérience a été réalisé avec d'autres glycosyltransférases clonées, impliquées dans la glycosylation terminale (Lowe *et al.*, 1990; Larsen *et al.*, 1990 ; voir la revue de Paulson, 1989b).

Ces résultats sont en faveur du concept suivant lequel l'expression des glycosyltransférases est un facteur prédominant dans la régulation de la biosynthèse terminale des structures glycaniques.

E - Rôles des glycanes membranaires

L'interaction cellule-cellule dans les organismes multicellulaires est un phénomène fondamental qui inclut la reconnaissance, l'adhésion et des réarrangements. La plupart de ces interactions sont induites par les composants de la surface cellulaire. Ces interactions sont importantes lors de la fertilisation, de la morphogenèse, du développement, de l'oncogenèse et de la métastase, de la réparation des tissus, et du maintien de la différenciation cellulaire. Ainsi, les glycoconjugués sont considérés, de par leur situation privilégiée, comme médiateurs d'interactions cellulaires, faisant intervenir des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifiques.

La proportion des glycanes liés par liaisons covalentes à la membrane plasmique des cellules eucaryotes varie entre 2 et 10% du poids de la membrane plasmique. La plupart de ces glycanes sont liés par des liaisons O- et N-glycosidiques aux protéines, et par des liaisons O-glycosidiques aux céramides. Toutefois, les glycoconjugués prédominants sont les glycoprotéines. Ces dernières comportent en effet 80% des glycanes de la surface membranaire. Les glycanes ont une distribution asymétrique et sont exposés à la surface externe de la membrane cellulaire. Malgré leur faible proportion par rapport au poids de la membrane, les glycanes peuvent recouvrir totalement la surface cellulaire et ainsi former la première couche interagissant avec les autres cellules. D'autres glycoconjugués sont librement associés à la membrane tels que le collagène sécrété, l'héparane sulfate et la fibronectine. Ces molécules contribuent à la formation de la matrice cellulaire.

1 - La "surface cellulaire", siège d'interactions

La surface cellulaire comprend à la fois la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. Le tout forme un ensemble fonctionnel, les interactions étroites entre la cellule et la matrice étant à la base de processus normaux (histogenèse, neurogenèse, angiogenèse) et pathologiques (invasion et métastase). Cet ensemble est par ailleurs en relation avec le cytosquelette.

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

a - La membrane cellulaire

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

La membrane plasmique présente une asymétrie fonctionnelle. 2 à 10 % en poids des membranes plasmiques normales sont constitués de glucides (Alberts *et al.*, 1983). La copule glucidique des composés membranaires est toujours située à l'extérieur de la cellule et forme en partie le "glycocalyx", considérablement épaissi quand la cellule se transforme. Les glycoconjugués de la surface cellulaire sont considérés, de par leur situation privilégiée, comme des médiateurs d'interactions cellulaires, faisant intervenir des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifiques. A ce titre, ils sont impliqués dans la cascade métastatique au niveau de l'invasion et de l'implantation des cellules tumorales au site secondaire (voir plus loin). Comme nous l'avons vu précédemment, les structures N-glycanniques peuvent jouer le rôle de masquage de sites antigéniques et, dans ce cas, permettent à la cellule d'échapper au système immunitaire.

Si les glycoconjugués sont porteurs des signaux de reconnaissance spécifiques de la cellule, des récepteurs lectiniques membranaires sont capables de reconnaître spécifiquement les informations portées par ces structures glycanniques et sont capables de former des complexes lectines-glycannes. De nombreuses études ont montré que la transformation maligne s'accompagne d'une modification de la glycosylation de surface cellulaire indépendante de l'origine histogénétique de la cellule et du processus induisant la transformation.

L'altération des informations portées par les glycanes de surface perturbe les systèmes spécifiques de reconnaissance, induisant notamment certaines étapes de la pathogenèse du cancer conduisant à la diffusion des cellules tumorales et aux manifestations organotropiques de la métastase. De même, l'existence de lectines endogènes propres aux cellules malignes (Gabijs *et al.*, 1987a ; 1987b ; 1987c ; Meromsky *et al.*, 1986), peut être impliquée dans l'altération des mécanismes de reconnaissance.

b - Matrice extracellulaire et cytosquelette

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de collagènes et d'élastine, noyés dans une "substance fondamentale" composée de protéoglycanes et de diverses (glyco)protéines, comme la fibronectine (revue de Hynes, 1985), la laminine (Foidart *et al.*, 1980) ou la thrombospondine (Lawler, 1986). Elle est en relation avec le réseau d'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de plaques d'adhésion faisant intervenir une pléiade de protéines intracellulaires telles la vinculine, la vimentine et la taline (consulter Alberts *et al.*, 1983), ou des complexes transmembranaires, tel celui de l'intégrine (Buck & Horwitz, 1987). Le cytosquelette est, quant à lui, responsable des mouvements cellulaires se déroulant au cours de la croissance, de l'invasion tumorale et au cours de la différenciation. La matrice joue également un rôle de "filtre" macromoléculaire et influence la différenciation, la morphogenèse et la mitose.

La cellule métastatique doit passer par plusieurs étapes avant de s'implanter dans le tissu cible. Elle va tout d'abord quitter la tumeur primaire, traverser l'endothélium et passer dans la circulation. Elle doit ensuite de nouveau traverser la barrière endothéliale ainsi que la lame basale sous-jacente, avant de s'implanter dans le parenchyme du tissu-cible.

Un nombre important d'études porte sur cette seule propriété d'invasion des cellules tumorales. Cette propriété fait intervenir non seulement la matrice extracellulaire, topologiquement indispensable, mais aussi le cytosquelette, dans la mesure où la cellule transformée change souvent de forme et que les mouvements cellulaires contribuent à la "réussite" du processus invasif (Grimstad, 1987).

A l'heure actuelle, il est clair que la transformation cellulaire affecte profondément les structures glycaniques de la surface cellulaire. De nombreux travaux ont révélé que l'acide sialique de glycoconjugués de la surface cellulaire jouent un rôle fondamental dans les systèmes de reconnaissance et peut, parfois, être lié à la malignité de la cellule. Comme nous l'avons vu précédemment ils contribuent largement au maintien de la conformation des glycanes. Nous allons donc développer dans le paragraphe suivant, le rôle et l'importance des acides sialiques.

2 - Rôles des acides sialiques

L'acide sialique est un composé essentiel des glycoprotéines et des glycolipides des membranes cellulaires. Il joue, en effet, un rôle important dans la reconnaissance, l'adhésion et les interactions cellulaires d'une part, et dans la réponse aux agents extérieurs comme les virus, les hormones et les toxines d'autre part.

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

L'acide sialique est largement répandu dans la nature, soit libre mais en faible quantité, soit lié aux glycolipides et glycoprotéines (Tuppy et Gottschalk, 1972). Il existe une grande diversité d'acides sialiques qui repose sur la substitution des différents groupements de l'acide neuraminique (fig. 17 page 56). L'acide sialique est lié sur la chaîne oligosaccharidique en configuration anomérique α . Nous ferons d'abord un rappel des structures oligosaccharidiques rencontrées au niveau des glycoconjugués.

L'acide sialique participe de manière active aux phénomènes biologiques régissant les fonctions cellulaires, et ceci pour plusieurs raisons :

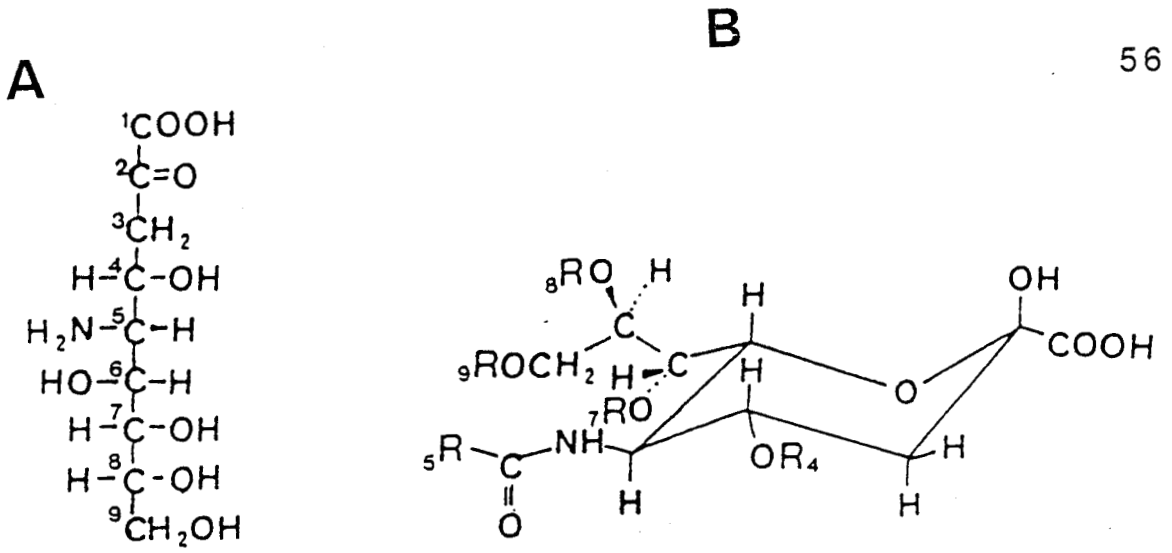
- Sa position terminale sur la chaîne oligosaccharidique
- Le nombre élevé de substitutions possibles sur les glycannes
- Sa forte charge électro négative (leur pKa avoisine pH 2)
- Les modifications du comportement biologique des cellules et des molécules désialylées

On distingue essentiellement 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. Inversement, par un effet de répulsion, il interdit la formation de ces agrégats (exemple : les érythrocytes).

2 - Il influe sur la conformation des glycoprotéines et agit de cette manière sur leur activité biologique et leur sensibilité vis-à-vis des protéases (mucines, orosomucoïde...).

3 - Les dérivés N- et O-acylés de l'acide neuraminique sont des déterminants antigéniques d'organismes unicellulaires et de Mammifères (Schauer, 1982) et peuvent aussi être des marqueurs de cancérisation tel que le Neu5Gc (Higashi *et al.*, 1985). Ils contribuent également à la spécificité



Acide 5-amino-3,5-didéoxy-D-glycéro-D-galacto-nonulosonique

R ₅	R ₄ · 7 · 8 · 9
$ \begin{array}{c} -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array} $	$-\text{H}$
$ \begin{array}{c} -\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \\ -\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array} $
	$-\text{CH}_3$
	$-\text{SO}_3\text{H}$
	$-\text{PO}_3\text{H}_2$

Figure 17: 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 ²C₅

des groupes sanguins M et N (Sadler *et al.*, 1979).

4 - L'acide sialique porté par les récepteurs membranaires d'hormones peptidiques est nécessaire à la reconnaissance et à l'interaction de ces récepteurs avec les hormones (insuline, gonadotropine), avec les toxines (cholérique et tétanique) de virus, avec les spermatozoïdes, ainsi qu'avec certaines espèces de mycoplasmes.

5 - Il peut aussi inhiber la reconnaissance d'un ligand avec son récepteur ou d'un site antigénique avec ses anticorps. Il intervient alors comme signal d'anti-reconnaissance. Plusieurs exemples peuvent illustrer ce phénomène de masquage. Une démonstration éclatante du rôle protecteur de l'acide sialique fut fournie par les travaux de Ashwell *et al.* en 1974. La désialylation de glycoprotéines circulantes, en dévoilant des résidus de galactose terminaux, provoque, par l'intermédiaire d'une lectine membranaire, leur capture, leur internalisation et leur dégradation dans les hépatocytes. D'autre part, les cellules de Küpffer, ainsi que les macrophages péritonéaux et spléniques, possèdent également un récepteur à galactose et sont responsables du catabolisme des érythrocytes âgés ou de cellules tumorales circulantes (Kolb *et al.*, 1983).

IV -TRANSFORMATION CELLULAIRE ET MODIFICATIONS DE LA GLYCOSYLATION DES N-GLYCOSYLPROTEINES

Actuellement, il est clair que le processus de mise en place du cancer ainsi que la modification des événements de la surface cellulaire sont les conséquences d'altérations affectant l'information biologique détenue dans le noyau. Le comportement cellulaire est en partie régi par ses propres interactions avec l'environnement. Les modifications de la surface cellulaire sembleraient précéder et seraient nécessaires à la mitose, à la différenciation et à la formation des organes. En effet, l'apparition de molécules d'adhésion spécifiques impliquées dans les interactions cellulaires ont pu être mises en évidence, entre autres, au niveau du foie (L-CAM) (Bertolotti, 1980) et des cellules nerveuses (N-CAM) (Rutishauser *et al.*, 1988). Récemment, Doherty *et al.* (1990) ont montré que la croissance neurale de cellules ganglionnaires rétinales embryonnaires de Poulet (RGC) transfectées par le gène N-CAM humain variait au cours du développement et était modulée par l'expression de structures polysialylées (α -2,8Neu5Ac) de la glycoprotéine N-CAM. Beaucoup de modifications dans le comportement cellulaire, caractéristiques de la transformation maligne,

affectent les propriétés membranaires, conduisant à une perte de l'inhibition de contact et à une diminution de l'adhésivité au substrat.

La transformation maligne s'accompagne d'un bouleversement du métabolisme, affectant tous les compartiments cellulaires. Dans la mesure où les glycoconjugués membranaires sont impliqués dans le comportement cellulaire, tout changement de ces molécules, associé à la transformation maligne, peut être lié au comportement anarchique des cellules transformées. Elle conduit à un profond changement des propriétés de la surface cellulaire. Depuis que Aub, dans les années 60, a décelé une modification de la glycosylation de la surface cellulaire de cellules malignes, de nombreux travaux ont permis de caractériser plus précisément les modifications affectant les O- et N-glycosylprotéines, ainsi que les sphingolipides.

On observe généralement une simplification des structures glycanniques des glycolipides et, inversement, une augmentation de la taille des glycannes des N-glycosylprotéines. Ce dernier phénomène peut être lié à :

- L'augmentation de l'antennarisation
- L'augmentation de la sialylation
- L'augmentation de la proportion de résidus de N-acétylglucosamine "intercalaires"
- L'apparition de structures polysialylées Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac
- L'apparition de structures poly-N-Acétillactosaminiques

En corrélation avec ces observations, l'augmentation de l'activité de certaines glycosyltransférases telles que les N-acétylglucosaminyltransférases III et V et les sialyltransférases ont pu être caractérisées.

A-Multi-antennarisation

L'une des altérations glycosidiques les plus communes au niveau des cellules transformées est la présence de structures oligosaccharidiques de masse moléculaire élevée (Warren *et al.*, 1978 ; Santer et Glick, 1979 ; Smets et van Beck, 1984 ; Kobata *et al.*, 1984).

Warren *et al.* (1972 ; 1978) ont démontré que la transformation cellulaire affectait profondément les glycannes de surface cellulaire et, plus particulièrement, les N-glycosylprotéines. En effet, la masse des glycannes est augmentée sous l'effet de l'augmentation de la proportion des glycannes tri- et tétra-antennés et d'une hypersialylation de ces structures. Cette modification structurale a permis de suggérer l'existence d'une dysrégulation des N-acétylglucosaminyltransférases responsables des augmentations branchements additionnels dans les glycannes lors de la transformation cellulaire (Montreuil *et al.*, 1983).

Les travaux entrepris dans notre Laboratoire (Debray *et al.*, 1983) sur des cellules BHK et leurs

homologues transformés par le virus du Sarcome de Hamster (Cellules BHK/HSV) ont montré une augmentation du nombre d'antennes des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires dans les cellules transformées et ceci d'après leur comportement en chromatographie d'affinité sur ConA. Ces différences ont été retrouvées dans les glycanes de la fibronectine sécrétée par ces mêmes cellules (Delannoy *et al.*, 1985). Ce résultat permet de penser que la transformation affecte les systèmes glycosyltransférasiques. La poly-antennarisation a, par ailleurs, été caractérisée dans ces mêmes cellules transformées par le virus du Polyome T (Yamashita *et al.*, 1984) ou par le virus du Sarcome de Rous (Pierce et Arango, 1986) et dans des lignées de cellules malignes uroépithéliales humaines (Debray *et al.*, 1986). Des fibroblastes de lignée Rat2 transformés par l'oncogène H-ras activé sont tumorigènes et métastatiques chez la Souris "nude" (Muschel *et al.*, 1985). Ces cellules montrent également une augmentation des structures comportant une branche GlcNAc(β 1-6)Gal (Collard *et al.*, 1985 ; Dennis *et al.*, 1987). D'autres oncogènes comme fps et src (mais pas myc) induisent le même phénomène chez les fibroblastes Rat2 (Dennis *et al.*, 1989a). Ces nombreux travaux ont pu montrer, dans l'ensemble, que la multi-antennarisation se traduisait plus particulièrement par une augmentation du branchement en β -1,6.

C'est ainsi que, en corrélation avec la multi-antennarisation, une enzyme a pu être caractérisée au cours de ces travaux : la N-acétylglucosaminyltransférase V (Yamashita *et al.*, 1984). En effet, cette enzyme est responsable du branchement d'un résidu de GlcNAc en α -1,6. L'augmentation de l'antennarisation a pu être corrélée avec une augmentation de l'activité de cette enzyme dans les cellules transformées et à haut pouvoir métastatique, dans de nombreux modèles cellulaires provenant de tumeurs ou de cellules transformées par des virus. Cette enzyme a également été caractérisée chez des fibroblastes de Rat (Rat2) transformés par l'oncogène Ha-ras et dans des carcinomes murins et humains (Dennis et Laferté, 1989).

Des observations plus récentes permettent de suggérer que l'augmentation des antennes liées en β -1,6 serait nécessaire ou liée au processus invasif des cellules malignes.

Ainsi, des mutants d'une lignée lymphoïde métastatique MDAY-D2 affectés dans leur glycosylation et montrant une diminution de l'activité N-acétylglucosaminyltransférase V et une perte des oligosaccharides branchés en β -1,6, sont tumorigènes, mais faiblement métastatiques (Dennis *et al.*, 1987).

Par ailleurs, les travaux réalisés par Humphries *et al.* en 1986 ont montré que l'utilisation de la swainsonine, inhibiteur spécifique du processus de biosynthèse des N-glycosylprotéines, affectait l'induction du branchement en β -1,6 ainsi que le pouvoir métastatique de ces cellules. Enfin, la transfection par ras d'une lignée de cellules de tumeurs mammaires de Souris SPI, lignée non métastatique, procure à la cellule un pouvoir invasif et une augmentation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Dennis *et al.*, 1987).

Il apparaît donc que l'antennarisation en β -1,6 pourrait bien être un marqueur métastatique.

Par ailleurs, des travaux récents tendraient à démontrer que l'augmentation de cette activité enzymatique dans les cellules transformées s'expliquerait davantage par l'augmentation de son

expression plutôt que par une modulation de son activité catalytique par le biais d'activateurs (Palcic *et al.*, 1990).

B - Augmentation de la sialylation

La charge de surface de la cellule pourrait bien jouer un rôle non négligeable dans les communications des cellules avec leur milieu environnant. Par ailleurs, nous savons qu'elle interviendrait dans la perméabilité membranaire et la diffusion passive de certains ions à travers la membrane, mais aussi au niveau de la conformation et de l'activation d'enzymes membranaires (Pâquet et Moscarello, 1985).

C'est par l'étude des paramètres biophysiques de la surface cellulaire que l'on a pu tout d'abord corréler cette augmentation de la densité de charge de la surface avec la malignité de la cellule. Les paramètres biophysiques tels que la charge nette, sont en grande partie déterminée par la composition en acides sialiques. La variation de la charge de surface lors de la transformation cellulaire apparaît très tôt (4 à 8 heures) et précède la perte des molécules de fibronectine de surface cellulaire.

Des études plus fines de la composition en acides sialiques effectuées par Bosmann *et al.* (1973) et Yogeewaran *et al.* (1978) ont décelé une augmentation de la libération des acides sialiques de surface cellulaire par des neuraminidases dans des lignées de cellules de mélanome B16 comparées à des lignées des mêmes cellules à faible pouvoir métastatique.

Par ailleurs, Warren *et al.* (1972) observaient que la transformation de cellules BHK par des virus à RNA (RSV) et à ADN (polyome) induisait une augmentation de la taille des glycopeptides membranaires qui, après action de la neuraminidase, voyaient leur masse moléculaire se réduire et se superposer à celle des témoins. Ces résultats convergent tous dans l'idée que la transformation maligne cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la sialylation de surface cellulaire.

Certaines lectines comme la WGA permettent de sélectionner à partir de cellules à haut pouvoir métastatique, des mutants résistants faiblement métastasant. La sélection de lignées du mélanome B16 par cette technique a permis de montrer que la diminution du pouvoir métastatique s'accompagne d'une diminution du taux d'acides sialiques de surface. Des travaux analogues ont été réalisés sur d'autres modèles (Yogeewaran et Salk, 1981), ce qui a pu renforcer l'hypothèse que le pouvoir métastatique serait bien lié au taux de sialylation de surface. Cette affirmation est toutefois trop simpliste. En effet, des modifications de structure de sialoglycoconjugués pourraient d'avantage être corrélées avec certaines caractéristiques de malignité. La corrélation la plus juste serait le pourcentage de sialylation des groupements galactosyl et N-Acétylglucosaminyl. Warren *et al.* (1978), en comparant les lignées métastatiques MDAYD2 et ces même cellules résistantes à la WGA MDW40, non-métastatiques, montraient que les glycanes des glycopeptides de ces dernières

étaient particulièrement affectées (disparition des acides sialiques, mais aussi du galactose). Passaniti et Hart en 1988, en comparant des souches de mélanome murins B16 à potentialité métastatiques différentes, ne montrent pas de corrélation entre le taux de sialylation et leur pouvoir métastatique. Ils ont même observé que le taux de sites oligosaccharidiques membranaires sialylables diminuait significativement dans les cellules à haut pouvoir métastatique.

Les études concernant les activités sialyltransférasiques sont très controversées (Nicolson, 1982 ; Schirmacher, 1982 ; Yogeewaran et Salk, 1981). Ainsi, les travaux menés sur la transformation de fibroblastes par les virus SV40 et le polyome T ont montré dans chaque cas que le taux d'acides sialiques diminuait de façon significative et que cette diminution de la sialylation était corrélée avec une diminution des activités sialyltransférasiques (Grimes, 1970). Au contraire, Bosmann et Hall en 1971 démontraient que les activités sialyltransférasiques étaient augmentées de façon significative dans des cellules invasives de colon et de poumon humains. Ceci fut confirmé par Kishore *et al.* en 1985 (Tableau IV page 62).

Enfin, des résultats obtenus dans notre laboratoire montrent une corrélation directe de la sialylation avec la malignité, et, de même, une nette augmentation des activités sialyltransférasiques des cellules NIH 3T3 et BHK à la suite de la transformation par l'oncogène ras activé.

Cependant, et malgré toutes ces réserves, il apparaît généralement une augmentation sensible des activités sialyltransférasiques dans les cellules tumorales.

La plupart des études effectuées ont montré une élévation des activités sialyltransférasiques dans le sang de patients atteints d'un cancer. Cependant, l'activité sialyltransférasique sérique reste sensiblement voisine de la normale lorsque la tumeur maligne est aux premiers stades de son développement. Elle n'est en fait réellement significative que lorsque la tumeur est nettement développée et lors de l'apparition des métastases (Chatterjee *et al.*, 1979a ; 1979b ; Ronquist *et al.*, 1980 ; Kessel *et al.*, 1981 ; Licata *et al.*, 1982 ; Griffiths et Reynolds, 1982 ; Dairaku *et al.*, 1983 ; Berge *et al.*, 1984 ; Ronquist *et al.*, 1980 ; 1982 ; 1983 ; Bernacji et Untae, 1977 ; Frithz *et al.*, 1985 ; Hermann *et al.*, 1979).

L'origine tissulaire de ces sialyltransférases sériques reste incertaine. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une "fuite" des activités enzymatiques membranaires des cellules néoplastiques.

C - Augmentation de la proportion de glycannes portant un résidu de N-acétylglucosamine en position "intercalaire"

En 1983, Kobata *et al.* ont montré, lors de l'étude de la gamma-glutamyl transpeptidase de foie de Rat, l'apparition d'une proportion importante de glycannes possédant un résidu de N-acétylglucosamine en position "intercalaire" sur la glycoprotéine isolée de foie hépatomateux, ces structures étant absentes dans l'enzyme isolée du foie normal (Yamashita *et al.*, 1983). Toutefois, cette observation n'a été faite que chez un seul type cellulaire et que pour une seule glycoprotéine.

Tableau IV: Exemples de modifications des activités sialyltransférasiques décrites au cours de la transformation de différentes souches cellulaires. (voir revue de Schauer *et al.*, 1982)

Mode of alteration	Tissue, cell (-organelle)	References.	
Decrease	SV-40-3T3 cells	GRIMES 1970, 1973	
	Py-BHK cells	DEN <i>et al.</i> 1971	
	Morris hepatoma 7777, 7800	HUDGIN <i>et al.</i> 1971	
	thyroid tumor (rat)	MONACO and ROBBINS 1973	
	ascites hepatoma cells	SAITO <i>et al.</i> 1974	
	Morris hepatoma 9618A ₂ , 3924A	BAUER <i>et al.</i> 1977, REUTTER and BAUER 1978	
	mammary tumors (rat)	KEENAN and MORRÉ 1973, CHATTERJEE 1979	
Increase	Py-3T3-, MSV-3T3-, RSV-3T3 cells	BOSMANN 1972	
	RSV-BHK cells	WARREN <i>et al.</i> 1972	
	mammary and colon carcinomas (human)	BOSMANN and HALL 1974	
	serum (carcinoma-bearing rats)	BOSMANN <i>et al.</i> 1975, IP and DAO 1977	
	serum (mammary tumor-bearing rats)	BOSMANN and HILF 1974, BERNACKI and KIM 1977, CHATTERJEE 1979	
	serum (melanoma-bearing mice)	KONDO <i>et al.</i> 1981	
	liver (Walker sarcoma-bearing rats)	IP and DAO 1977	
	serum (patients with different malignant, and benign, diseases)	KESSEL and ALLEN 1975, BAYER <i>et al.</i> 1977, GANZINGER 1977, HENDERSON and KESSEL 1977, IP and DAO 1978, DAO <i>et al.</i> 1980, RONQUIST <i>et al.</i> 1980	
	Unchanged	Morris hepatoma 5123 D	HUDGIN <i>et al.</i> 1971
		colon carcinoma (human)	KIM <i>et al.</i> 1974

V - CONCLUSION

Cet exposé général nous a permis de rappeler le rôle fondamental que jouent les oncogènes dans le processus de transformation cellulaire. Les oncogènes, qui dérivent de l'activation de gènes normalement présents et exprimés dans les cellules, provoquent la transformation cellulaire en interférant et en perturbant les mécanismes qui contrôlent les différentes étapes de la mitose et de la multiplication cellulaire.

Ces oncogènes ont été identifiés dans les cellules isolées de tumeurs. C'est, en particulier, le cas de l'oncogène ras que l'on retrouve associé à certains cancers humains.

Parallèlement, la transformation maligne provoque de profonds remaniements de la structure des glycanes qui se traduisent dans le cas des N-glycosylprotéines, par une augmentation des structures tri- et tétra-antennées et du taux de sialylation.

En outre, ces modifications structurales semblent être un facteur favorisant la diffusion métastatique des cellules tumorales. Elles sont le reflet de modifications de l'activation de glycosyltransférases qui contrôlent leur biosynthèse. De plus, ces modifications peuvent être dissociées dans des cellules transformées par transfection d'un seul oncogène tel que l'oncogène ras. C'est dans ce cadre, et afin de tenter de mieux définir les relations qui existent entre les oncogènes et l'activité des glycosyltransférases, en particulier des sialyltransférases, que nous avons entrepris cette étude.

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

MEMOIRE I :

**ETUDE DES MODIFICATIONS DE LA SIALYLATION DES
CELLULES BHK21/C13 APRES TRANSFECTION *IN VITRO* PAR
L'ONCOGENE HUMAIN C-HA-RAS**

INTRODUCTION

Depuis les premières observations de Warren *et al.*(1972) des études structurales fines ont montré que la glycosylation des glycoconjugués membranaires en général, et des N-glycosylprotéines, en particulier, était profondément modifiée par la transformation maligne (Smets et van Beek, 1984).

Cette modification s'accompagne principalement d'une augmentation de la sialylation et de la proportion des glycannes tri- et tetra-antennés au préjudice des structures bi-antennées (Montreuil *et al.*, 1983 ; Yamashita *et al.* , 1984 ; Delannoy *et al.*, 1985).

Ces travaux furent menés dans un premier temps sur des tumeurs malignes et sur des cellules transformées par des virus. Un peu plus tard, les oncogènes se sont avérés être des outils très intéressants pour l'étude et la "dissection" du processus de la cancérisation. Nous savons actuellement qu'un oncogène transformant suffit pour transformer une cellule *in vitro* et modifier profondément les structures glycaniques de la surface cellulaire, de la même façon que dans le processus de cancérisation classique (Bolscher *et al.*, 1988 ; Santer et Glick, 1989 ; Dennis *et al.*, 1989a) .

Sur cette base nous avons étudié la composition en acides sialiques et les modifications des activités sialyltransférasiques de fibroblastes de rein de Hamster (BHK) transformés par l'oncogène humain c-Ha-ras EJ. Les cellules transformées par l'oncogène ras sont tumorigènes voire métastasantes après injection chez la Souris "nude".

L'essentiel des résultats est présenté dans le mémoire suivant qui est accepté pour publication aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.

Note aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.

Série III : Biochimie Cellulaire / Cellular Biochemistry.

MODIFICATIONS DE LA SIALYLATION DES CELLULES BHK 21/C13 APRES TRANSFECTATION *IN VITRO* PAR L'ONCOGENE HUMAIN *c-Ha-ras*.

Haris CAZLARIS, Nadia LE MARER, Vincent LAUDET, Christian LAGROU, Qin ZHU, Philippe DELANNOY et Jean MONTREUIL.

Résumé - Une lignée cellulaire de fibroblastes de rein de Hamster (BHK 21/C13) a été transfectée par l'oncogène humain *c-Ha-ras*. L'expression de l'oncogène a modifié l'activité sialyltransférase globale de l'homogénat cellulaire de manière significative. Cette activité est, en effet, multipliée par 2,5 en moyenne quel que soit l'accepteur utilisé. En outre, la proportion d'acide N-glycolylneuraminique associé à la surface cellulaire a sensiblement augmenté dans les cellules transfectées, le rapport acide N-acétylneuraminique / acide N-glycolylneuraminique passant de 7,10 à 2,80.

Ces résultats mettent en évidence, dans les cellules transfectées par *c-Ha-ras*, une relation étroite entre l'expression de l'oncogène et le métabolisme des acides sialiques et suggèrent, en outre, qu'il existe une régulation génique de la sialylation des glycoconjugués.

MODIFICATIONS OF SIALYLATION IN BHK 21/C13 CELLS TRANSFECTED BY *c-Ha-ras* HUMAN ONCOGENE.

Abstract - A Hamster kidney fibroblast cell line (BHK 21/C13) has been transfected by *c-Ha-ras* human oncogene. The expression of the oncogene

significantly modified the global sialyltransferase activity of the cell extract. This activity is enhanced on an average 2.5 fold whatever the acceptor. In addition, the proportion of cell-surface associated N-glycolylneuraminic acid is enhanced in transfectants, the ratio N-acetylneuraminic acid / N-glycolylneuraminic acid decreases from 7.10 to 2.80.

These results suggest that a tight relationship exists, in c-Ha-ras transfected BHK cells, between the expression of the oncogene and the neuraminic acid metabolism as well as a gene regulation of glycoconjugate sialylation.

Abridged english version - Since the first observations of Warren [1], fine structural analyses have shown that the glycosylation of membrane glycoconjugates was greatly modified by malignant transformation [2]. Especially for N-linked glycans, it appeared an increase of the sialylation and of the proportion of tri- and tetra-antennary glycans [3-5]. Moreover, these modifications seem to be associated with tumorigenic and metastatic potential of transformed cells [6-8]. Beside this, authors attribute to N-glycolylneuraminic acid a role as marker of the cell differentiation [9] and tumorigenicity [10].

For the moment, the mechanism of the modifications of glycan structures is not known according to the fact that little is known about the regulation of the glycosylation processing enzymes. However, it is possible to propose that such disorders are the reflect of a genic misregulation of the enzymes expression. Oncogene transfection of cells appeared to be a good model to verify this hypothesis knowing that modifications of N-linked glycans from murine fibroblast cell surface [11-14] have been described after transfection of *ras* oncogene.

In this paper we demonstrate that, after transfection of *ras* oncogene, the sialyltransferase activity of BHK 21/C13 cells is

significantly increased and that this phenomenon is associated with an important increase of N-glycolylneuraminic acid content.

psv2neo [15] and *psv2neo* EJ [16] plasmids were transfected [17] in BHK 21/C13 cells [18]. Cells were selected with geneticine G418 and the presence of the *c-Ha-ras* gene was demonstrated with classical methods [20]. Sialyltransferase activity was determined by incubation of 60 μ l of cellular homogenates with 30.74 nmol of CMP-[U-¹⁴C]-Neu5Ac (6.50 mCi/mmol, 255 μ M), 1 mM of 2,3-dehydro-2-deoxy-Neu5Ac, 25 mM of sodium cacodylate buffer pH 6.5 and with one of the glycoproteic acceptor (asialo-fetuin, asialo-orosomuroid or asialo-serotransferrin) at a final concentration calculated to obtain 0.8 mM of terminal galactose residues. Sialic acids were liberated by methanolysis (HCl 0.1 N in anhydrous methanol, 80°C, 1 h), permethylated [24] and methylated derivatives were analysed by g.l.c.-m.s.

Transfection and selection steps allow us to obtain two cell populations, respectively termed BHK*ras* and BHK*neo*. Southern blot analysis (Fig. 1), after digestion by Bam HI [20], has shown that the *c-Ha-ras* gene was present in the transfectants BHK*ras*. KpnI digestion revealed that the cell population was clonal. Moreover, immunoprecipitation analysis (Fig. 2) reveals that *ras* introduced gene is well expressed as 21 kDa protein in BHK*ras*.

Measure of the transfer capacity of [¹⁴C]-Neu5Ac by the cell homogenates onto the three different asialo-glycoproteic acceptors indicated that sialyltransferase activity of BHK*ras* was greatly increased (about 2.5 fold) whatever the acceptor (Table I). Determination of V_{max} and apparent K_m values using double reciprocal 1/V vs 1/S plot (Table II) indicates that there is no significant change in K_m values between BHK and BHK*ras* suggesting that the enhancement of activity was the reflect of the sur-expression of sialyltransferase in transfected cells.

Mass spectrometry analysis of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids methylated derivatives allowed us to identify these compounds in both cell lines on the basis of typical fragments of Neu5Ac (m/e 129, 348 & 376) and Neu5Gc (m/e 159, 378 & 406) and we observed the increase of the proportion of Neu5Gc in transfected cells (Table III). The proportion of Neu5Gc which represents 12.3 % of total sialic acid in BHK cells, shifted to 26.1 % in BHK*ras* cells.

According to Dennis *et al.* [25], transformation of fibroblasts by *ras* oncogene enhances the activity of the N-acetylglucosaminyltransferase V, the key-enzyme of β -1,6-antenna biosynthesis (linked to the α -1,6 mannose residue of N-linked glycans). On the contrary, Santer *et al.* [14] associate to this transformation structural modifications of terminate sugars of glycans from N-glycosylproteins. In particular, the authors have shown the high sialylation rate of glycans isolated from murine fibroblasts transformed by *ras*. Our results lead to the same conclusion using a different cellular model. Moreover, we have observed a qualitative modification of sialic acids composition, the proportion of Neu5Gc increasing in transfected BHK. These observations allow us to postulate that tight relationships exist between the expression of the oncogene and the activity of the enzymes responsible for the synthesis of the terminal part of N-linked glycans. This opens the way of the regulation of glycosyltransferases expression in cells transformed by oncogenes.

INTRODUCTION. - Depuis les premières observations de Warren [1], les études structurales fines qui ont suivi ont montré que la glycosylation des glycoconjugués membranaires, en général, et des N-glycosylprotéines, en particulier, était profondément modifiée par la transformation maligne [2]. Dans ces dernières, en effet, on note principalement une

augmentation de la sialylation et de la proportion des glycanes tri- et tétra-antennés au préjudice des structures bi-antennées [3-5]. En outre, ces modifications semblent être en relation avec le pouvoir tumorigène et métastatique des cellules transformées [6-8]. D'autre part, des auteurs attribuent un rôle de marqueur de différenciation [9] et de tumorigénicité [10] à la forme N-glycolylée de l'acide neuraminique.

Pour l'instant, les mécanismes de la transformation des structures glycaniques ne sont pas connus en raison du peu d'informations que nous possédons sur la régulation des enzymes de la glycosylation. On peut toutefois poser en hypothèse que ces modifications sont au moins le reflet de perturbations de l'expression génique de ces derniers.

La transfection de cellules "saines" par des oncogènes nous est apparue comme un excellent moyen pour vérifier cette hypothèse d'autant que divers travaux montraient que la transfection par l'oncogène *ras* induisait de profondes modifications de la structure des glycanes de la surface de fibroblastes murins [11-14].

Dans la présente Note, nous démontrons que, sous l'effet de la transfection de l'oncogène *ras*, l'activité sialyltransférase des cellules BHK 21/C13 s'accroît de manière très significative et que ce phénomène s'accompagne d'une augmentation importante de la teneur des glycoconjugués cellulaires en acide N-glycolylneuraminique.

MATERIELS ET METHODES.

Transfection, culture cellulaire et analyse des ADN. - Les plasmides pSV2*néo* [15] et pSV2*néo* EJ [16] ont été transfectés [17] dans les cellules BHK 21/C13 [18]. Ces dernières ont été cultivées dans un milieu minimum de Eagle modifié (DMEM) [19], en présence de Gentamycine (0,8 mg/ml), de Fungizone (5 mg/l) et de 10 % de sérum de Veau foetal. Les

cellules transfectées ont été ensuite sélectionnées en présence de sulfate de généticine G418 à 1 mg/ml sur une période de 20 jours et la présence du gène *c-Ha-ras* a été démontrée par les techniques classiques [20].

Immunoprécipitation de la protéine p²¹ traduite du gène ras. - 10⁶ cellules ont été marquées métaboliquement par incubation pendant 18 h dans 2 ml de milieu DMEM sans méthionine, en présence de 200 µCi de L-[³⁵S]-méthionine (800 Ci/mmol, Amersham). Les cellules ont été ensuite lysées dans un tampon Tris-HCl 10mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; NaCl 0,15 M; Triton X-100 1 %; désoxycholate de sodium 0,5 %; aprotinine 1 % et centrifugées à 100,000 x g pendant 1 h. La protéine p²¹ traduite du gène *ras* a été immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps monoclonal Y13-259 (Oncogene Science Inc.) [21].

Mesure des activités sialyltransférasiques. - Les cellules confluentes ont été lavées, puis homogénéisées par ultrasonnage pendant 30 sec dans un tampon de pH 6,5 (cacodylate de sodium 25 mM / NaCl 0,154 M / Triton X100 1 % / glycérol 20 %) à raison de 2x10⁷ cellules par ml. Les activités sialyltransférasiques ont été déterminées sur la fraction surnageante obtenue après centrifugation pendant 30 min à 10.000 g. Le mélange réactionnel utilisé contenait, dans un volume final de 120 µl, 60 µl d'homogénat cellulaire, 30,74 nmol de CMP-[U-¹⁴C]-Neu5Ac (6,50 mCi/mmol, soit 238,5 MBq/mmol), 1 mM de 2,3-déhydro-2-désoxy-Neu5Ac, 25 mM de tampon cacodylate de sodium / NaCl 0,154 M de pH 6,5 et un accepteur glycoprotéinique non sialylé à une concentration finale correspondant à 0,8 mM de résidus terminaux de galactose. Les accepteurs utilisés ont été la fétuine et l'orosomucoïde humain désialylés par l'acide trifluoroacétique 0,1 M (80°C; 40 min) et la sérotransferrine humaine désialylée par passage sur colonne de neuraminidase immobilisée [22]. La

composition glucidique des accepteurs a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoro-acétylation [23] afin de vérifier que la désialylation était bien totale. Nous nous sommes placés à une concentration élevée en CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac (255 μM) afin d'éliminer la possibilité d'une dilution isotopique du précurseur radio-marqué par le CMP-Neu5Ac endogène et nous avons, en outre, ajouté dans le milieu réactionnel 1 mM de 2,3-déhydro-2-désoxy- Neu5Ac afin de protéger les produits néosialylés de l'action des neuraminidases.

Dosage des acides sialiques - Les acides sialiques ont été libérés par méthanolyse (HCl 0,1 N dans le méthanol anhydre, 80°C, 1 h) de 10⁷ cellules lyophilisées. Cette étape a été suivie d'une perméthylation [24] et les dérivés méthylés ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire (0,4 mm x 60 m) de Silicone OV 101 (gradient de température 110-240°C; 10°C/min) et analysés par spectrométrie de masse (spectromètre Ribermag R 10-10).

RESULTATS.

Obtention des cellules et analyse génomique - Un plasmide contenant l'oncogène ainsi que le gène de sélection par la néomycine a été transfecté dans les cellules BHK 21/C13 (cellules BHK). La même opération a été effectuée avec le plasmide contenant uniquement le gène de résistance. Dans les deux cas, nous avons obtenu des clones résistants à la Gentamycine G418 (respectivement BHKras et BHKnéo) qui ont été rassemblés et amplifiés. Après digestion de l'ADN cellulaire total par l'endonucléase Bam H1 [20], une sonde c-Ha-ras s'hybridait avec un fragment de restriction de 6,6 kpb (Fig. 1) montrant ainsi que le gène c-Ha-ras EJ était bien présent dans les transfectants. D'autre part, la digestion

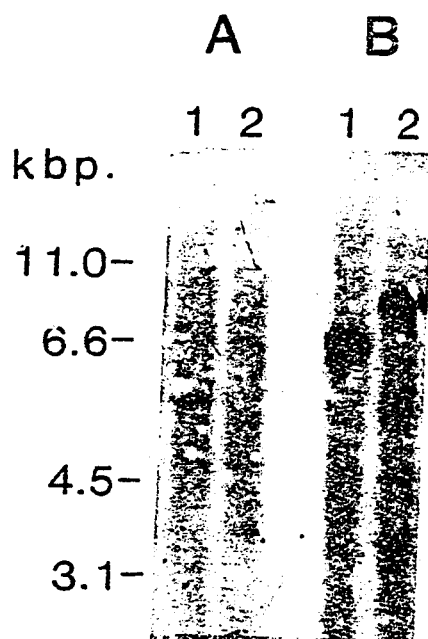


Fig. 1. - Détection par hybridation moléculaire de l'oncogène *c-Ha-ras* EJ dans les cellules BHK. L'ADN isolé de 10^7 cellules BHK (A) et BHKras (B) a été soumis à l'action des endonucléases de restriction Bam H1 (1) et Kpn 1 (2). Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose, transférés sur nitrocellulose, hybridés avec la sonde obtenue par digestion du gène *c-Ha-ras* par l'endonucléase Bam H1 [19] et révélés par autoradiographie.

par Kpn1 qui coupe le gène en un seul endroit, révélait que les transfectants BHK ras formaient une population clonale. Enfin, comme le montre la Fig. 2, la protéine p^{21} traduite du gène ras est parfaitement exprimée dans les cellules BHK ras .

Afin de déterminer l'activité biologique du gène introduit, il nous a paru utile d'étudier le comportement *in vivo* des cellules BHK ras . Après injection sous-cutanée chez le Hamster, les cellules BHK et BHKnéo n'ont produit que des tumeurs primaires, tandis que les cellules BHK ras ont donné naissance à des tumeurs primaires et à des métastases (résultats non présentés).

Mesure de l'activité sialyltransférasique - L'activité sialyltransférasique des cellules BHK et BHK ras a été mesurée par transfert de [^{14}C]-Neu5Ac sur trois accepteurs glycoprotéiniques désialylés. Dans tous les cas, l'activité sialyltransférasique des cellules BHK ras était fortement augmentée (environ 2,5 fois) (Tableau I). Il apparaît donc que la transfection par l'oncogène ras induit une augmentation importante de l'activité sialyltransférasique des cellules BHK indépendamment de la nature de l'accepteur.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons déterminé l'influence de la concentration en accepteurs, asialo-fétuine et asialo-orosomucoïde, sur l'activité enzymatique. Les résultats obtenus sont présentés dans la Fig 3. Dans les deux cas, nous avons pu déterminer les valeurs de V_{max} et de K_m par la représentation de $1/V$ en fonction de $1/S$. Les résultats, rassemblés dans le Tableau II, indiquent qu'il n'existe pas de différence significative du K_m apparent de l'enzyme entre cellules BHK et BHK ras , suggérant ainsi que l'augmentation d'activité n'était pas la conséquence d'un changement de l'affinité de

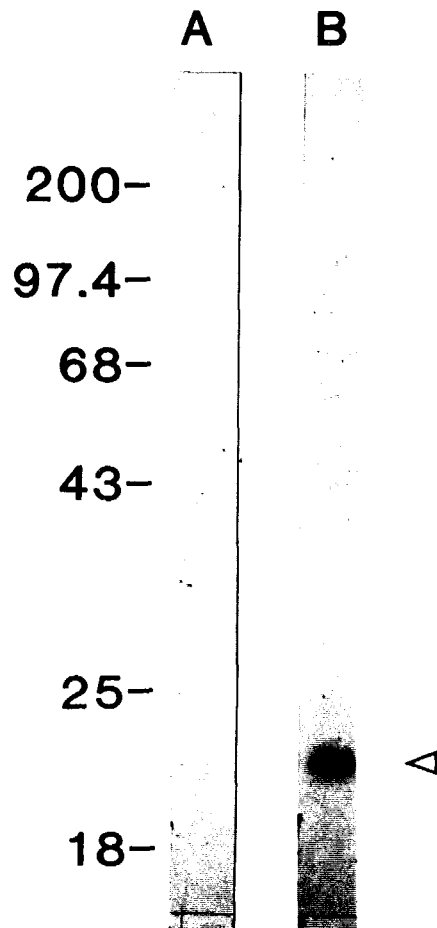


Fig. 2. - Détection par immunoprécipitation de la protéine P^{21} traduite du gène *ras*. Les cellules BHK (A) et BHK ras (B) ont été marquées métaboliquement par la L- $[^{35}S]$ -méthionine. Les cellules ont ensuite été lysées et la protéine P^{21} a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps monoclonal dans les conditions décrites dans le chapitre "Matériels et Méthodes", fractionnée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (gel de 12,5 %) et visualisée par autoradiographie [21]. La colonne de gauche indique la position des protéines utilisées comme marqueurs de masses moléculaires. La position de la protéine P^{21}_{ras} est indiquée par une flèche.

TABLEAU I

Activités sialyltransférasiques des homogénats des cellules BHK et BHKras vis-à-vis d'accepteurs asialo-glycoprotéiniques.

TABLE I

Sialyltransferase activities of BHK and BHKras cell homogenates with asialo-glycoproteins as acceptors.

Accepteurs	Activité sialyltransférasique (pmol/h/mg protéine)*		
	BHK	BHKras	BHKras/BHK
Asialo-transferrine	95,1 ± 25,4	249,2 ± 30	2,62
Asialo-féтуine	466,8 ± 32,1	1306,7 ± 21,4	2,80
Asialo-orosomucoïde	402,5 ± 36,9	877,6 ± 56	2,18

* : Les valeurs sont la moyenne de 3 expériences.

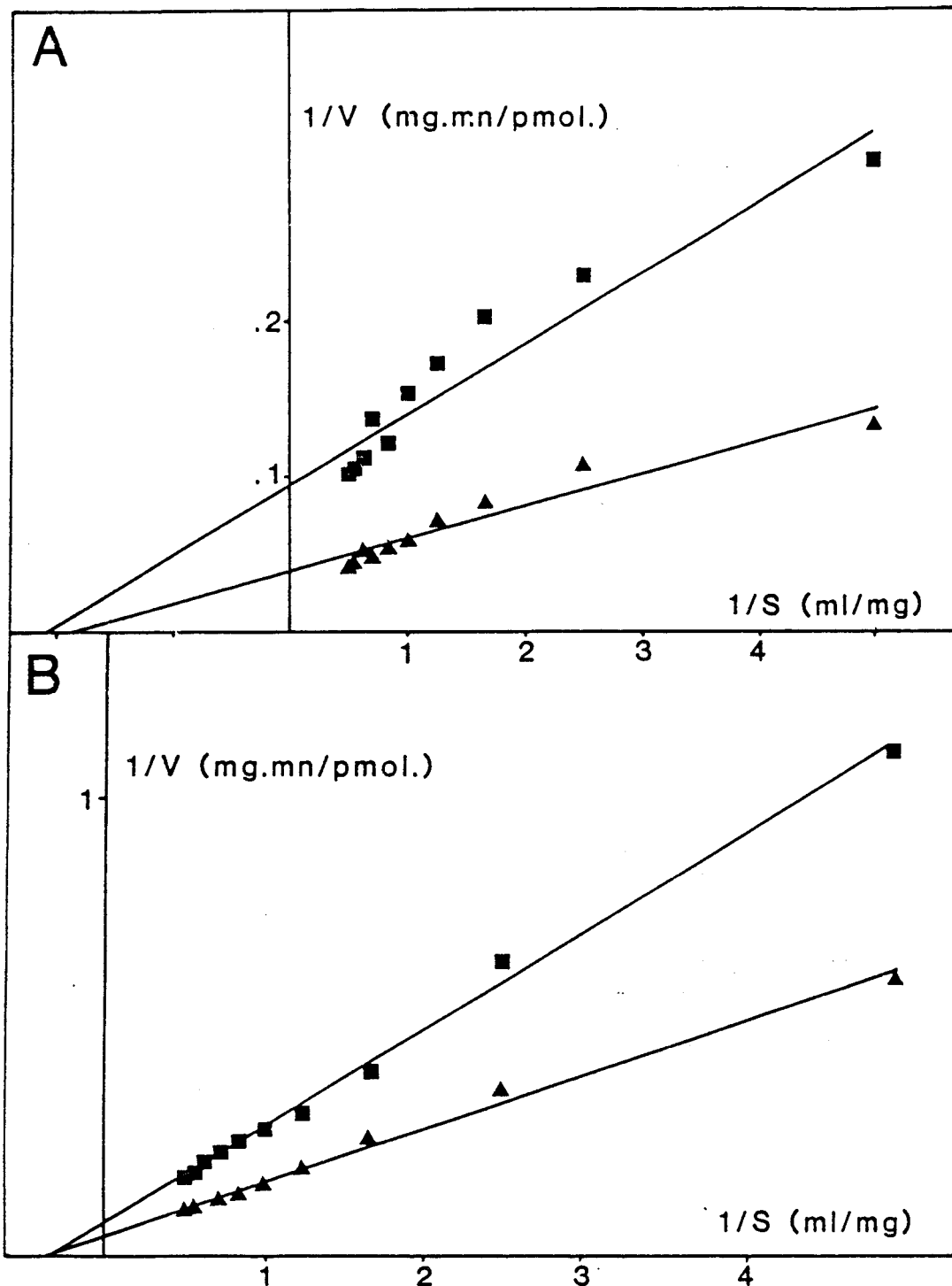


Fig. 3. - Effet de la concentration en asialo-orosomucoïde (A) et en asialo-fétuine (B) sur l'activité sialyltransférase des homogénats cellulaires des cellules BHK (—■—■—) et BHKras (—▲—▲—).

Les incubations ont été réalisées dans un tampon cacodylate de pH 6,5 et à 37°C pendant 2 h. Nous avons déterminé les valeurs de V_{max} et de K_m apparent par une représentation en double inverse $1/V$ en fonction de $1/S$.

TABLEAU II

Paramètres cinétiques de l'activité sialyltransférasique mesurée dans les homogénats de cellules BHK et BHKras en utilisant l'asialo-orosomucoïde et l'asialo-fétuine comme accepteurs. Les valeurs de Km apparent et de Vmax ont été extraites des représentations en double inverse présentées dans la Fig. 3.

TABLE II

Kinetic parameters of sialyltransferase activity measured in BHK and BHKras cell homogenates using asialo-orosomucoïd and asialo-fetuin as acceptors. Values of apparent Km and Vmax were obtained by analysis of double reciprocal plots shown in Fig. 3.

Accepteur	Homogénat cellulaire	Km apparent (mg/ml)	Vmax (pmol/mg.mn)	Vmax/Km
Asialo-orosomucoïde	BHK	0,47	10,2	21,7
	BHKras	0,54	26,9	49,8
Asialo-fétuine	BHK	2,97	12,6	4,24
	BHKras	2,99	25,7	8,60

l'enzyme pour son substrat, mais vraisemblablement d'une sur-expression de l'enzyme dans les cellules transfectées.

Détermination de la composition en acide N-glycoloylneuraminique -

L'analyse par spectrométrie de masse des dérivés méthylés des acides N-acétyl- et N-glycolylneuraminiques nous a permis d'identifier sans ambiguïté ces deux composés et de les doser sur la base des fragments caractéristiques du Neu5Ac (m/e 129, 348 et 376) et du Neu5Gc (m/e 159, 378 et 406). Les résultats de ces analyses, présentés dans le Tableau III, font apparaître une augmentation sensible du pourcentage de Neu5Gc dans les cellules transfectées. Le Neu5Gc, qui représente 12,3 % de l'acide sialique total des cellules BHK, voit, en effet, sa proportion passer à 26,1 % dans les cellules BHK_{Kras}.

DISCUSSION

D'après les travaux de Dennis *et al.* [25], la transformation de fibroblastes par l'oncogène *ras*, entraîne une augmentation d'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V, enzyme-clé de la biosynthèse de l'antenne liée en β -1,6 sur le résidu de mannose α -1,6 des glycanes des N-glycosylprotéines. En revanche, Santer *et al.* [14] associent à cette transformation des modifications structurales de l'extrémité terminale des glycanes des N-glycosylprotéines. Ces auteurs ont, en particulier, montré la forte sialylation des glycanes isolés de fibroblastes murins transformés par *ras*. Les résultats que nous avons obtenus nous amènent à la même conclusion, mais dans un système cellulaire différent. En effet, après avoir vérifié la validité de notre modèle (présence de l'oncogène dans les cellules transfectées, tumorigénicité et potentialité métastatique), il nous est apparu que les cellules BHK_{Kras} présentaient une

TABLEAU III

Proportion relative (en %) des dérivés méthylés du Neu5Ac et du Neu5Gc dans les méthanolysats des cellules BHK et BHKras. Le rapport Neu5Ac/Neu5Gc a été calculé sur la base d'un mélange équimolaire témoin des dérivés perméthylés du Neu5Ac (temps de rétention : $14,02 \pm 0,08$ min) et du Neu5Gc (temps de rétention : $18,53 \pm 0,10$ min). Les valeurs sont la moyenne de 2 expériences.

TABLE III

Relative proportion (in %) of Neu5Ac and Neu5Gc methylated derivatives in the methanolysates of BHK and BHKras cells. The Neu5Ac/Neu5Gc ratio was calculated on the basis of an equimolar standard ratio of the permethylated derivatives of Neu5Ac (retention time : 14.02 ± 0.08 min) and Neu5Gc (retention time : 18.53 ± 0.10 min). Values are an average of two experiments.

	Lignées cellulaires	
	BHK	BHKras
Neu5Ac	$87,7 \pm 0,4$	$73,9 \pm 0,8$
Neu5Gc	$12,3 \pm 0,5$	$26,1 \pm 0,7$
Neu5Ac / Neu5Gc	7,1	2,8

activité sialyltransférase accrue qui explique l'apparition de structures glycaniques fortement sialylées dans les cellules transfectées. En outre, nous avons observé une modification qualitative de la composition en acides sialiques, la proportion en acide N-glycolylneuraminique étant augmentée de manière significative.

Ces observations permettent de poser en hypothèse qu'il existe des relations étroites entre l'expression de l'oncogène et l'activité des enzymes responsables de la synthèse de la partie terminale des glycanes. Ceci nous ouvre la voie de la régulation de l'expression des glycosyltransférases dans les cellules transformées par l'action d'un oncogène.

Remerciements : Les auteurs remercient Jean-Pierre De Cavel (Animalerie de l'Institut Pasteur de Lille) et Anne Honvault, technicienne du CNRS, pour leur précieuse aide technique, ainsi que Jean Coll et Olivier Delmas pour leur intérêt constant et leur disponibilité. Ce travail a reçu le soutien financier du Centre National de la Recherche Scientifique (UMR n°111 : Relations structure - fonction des constituants membranaires; Directeur : Prof. J. Montreuil), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois et de l'Institut Pasteur de Lille.

H.C., N.L.M., Q.Z., Ph.D. et J.M. : Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherches du C.N.R.S. n° 111), 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tél : 20.43.48.83.

V.L. et C.L. : Unité d'Oncologie Moléculaire, Unité I.N.S.E.R.M. n° 186 et Unité Associée au C.N.R.S. n° 041160, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France. Tél : 20.87.79.78.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C.A. BUCK, M.C. GLICK et L. WARREN, *Biochemistry*, 9, 1970, p. 4567-4576.
- [2] L.A. SMETS et W.P. VAN BEEK, *Biochim. Biophys Acta*, 738, 1984, p. 237-249.
- [3] J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE et P. DELANNOY, in *Structural Carbohydrates in the Liver*, M. POPPER, W. REUTTER, E. KÖTTGEN et F. GUDAT éd., M.T.P. Press, England, 1983, p. 239-258.
- [4] P. DELANNOY, H. DEBRAY et J. MONTREUIL, *C. R. Acad. Sci.*, 301, 1985, p. 767-771.
- [5] K. YAMASHITA, T. OKHURA, Y. TACHIBANA, S. TAKASAKI et A. KOBATA, *J. Biol. Chem.*, 259, 1984, p. 10834-10840.
- [6] G. YOGESWARAN et P. SALK, *Science*, 212, 1981, p. 1514-1516.
- [7] J.G. COLLARD, J.F. SCHIJUEN, A. BIKKER, G. LA RIVIERE, J.G.M. BOLSCHER et E. ROOS, *Cancer Res.*, 46, 1986, p. 3521-3527.
- [8] J.W. DENNIS, S. LA FERTE, C. WAGHORNE, M.L. BREITMAN et S.R. KERBEL, *Science*, 236, 1987, p. 582-585.
- [9] D. BOUHOURS et J.F. BOUHOURS, *J. Biol. Chem.*, 258, 1983, p. 299-304.
- [10] Y. HIRABAYASHI, H. KASAKURA, M. MATSUMOTO, H. HIGASHI, S. KATO, N. KASAI et M. NAIKI *Japan. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1987, p. 251-260.
- [11] U.V. SANTER, F. GILBERT et M.C. GLICK, *Cancer Res.*, 44, 1984, p. 3730-3735.
- [12] J.G.M. BOLSCHER, M.M.W. Van der BIJL, J.J. NEEFJES, A. HALL, L.A. SMETS et H.L. PLOEGH, *EMBO J.*, 7, 1988, p. 3361-3368.
- [13] P. DELANNOY, H. CAZLARIS, V. LAUDET, C. LAUGROU, N. LE MARER et J. MONTREUIL, *Proc. 10th Intern. Symp. Glycoconjugates*, Jerusalem, 10-15 septembre 1989, p. 131.
- [14] U.V. SANTER, R. DESANTIS, K.J. HARD, J.A. VANKUIK, J.F.G. VLIEGENTHART, B. WON et M.C. GLICK, *Eur. J. Biochem.*, 181, 1989, p. 249-260.

- [15] P.J. SOUTHERN et P. BERG, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 1982, p. 327-341.
- [16] C.J. TABIN, S.M. BRADLEY, C.I. BARGMANN, R.A. WEINBERG, A.G. PAPAGEORGE, E.M. SCOLNICK, R. DHAR, D.R. LOWY et C. CHANG, *Nature*, 300, 1982, p. 143-149.
- [17] F.L. GRAHAM et A.J. Van der EB, *Virology*, 52, 1973, p. 456-467.
- [18] I. Mc PHERSON, *J. Natl. Cancer Inst.*, 30, 1963, p. 795-815.
- [19] I. Mc PHERSON et M. STOCKER, *Virology*, 16, 1962, p. 147-151.
- [20] T. MANIATIS, E.F. FRITSCH, et J. SAMBROOK, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [21] P. MARTIN, C. HENRY, F. FERRE, M. DUTERQUE-COQUILLAUD, C. LAGROU, J. GHYSDAEL, B. DEBUIRE, D. STEHELIN et S. SAULE, *EMBO J.*, 5, 1986, p. 1529-1535.
- [22] A.P. CORNFIELD, J.M. BEAU et R. SCHAUER, *Z. Physiol. Chem.*, 359, 1978, p. 1335-1342.
- [23] J.P. ZANETTA, W.C. BRENNENRIDGE et G. VINCENDON, *J. Chromatogr.*, 69, 1972, p. 291-304.
- [24] J. PAZ PARENTE, P. CARDON, Y. LEROY, J. MONTREUIL, B. FOURNET et G. RICART, *Carbohydr. Res.*, 141, 1985, p. 41-47.
- [25] J.W. DENNIS, K. KOSH, D.M. BRYCE et M.L. BREITMAN, *Oncogene*, 4, 1989, p. 853-860.

CONCLUSIONS

L'étude des activités sialyltransférasiques des homogénats cellulaires de BHK 21/C13 et de BHKras nous a révélé une augmentation significative de la capacité de transfert d'acide N-acétylneuraminique dans les cellules transformées, et ceci, quelque soit l'accepteur utilisé. Cette augmentation est directement en relation avec la présence de l'oncogène, les activités des cellules transfectées par le plasmide pSV2neo n'étant pas modifiées. Ces modifications ne sont pas dues, apparemment, à une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat, le Km ne variant pas, que l'on utilise comme accepteur l'asialo-orosomucoïde ou l'asialofétuine.

Ces résultats nous conduisent à penser que cette augmentation de la capacité de transfert repose essentiellement sur une augmentation de l'expression de certaines sialyltransférases dans la cellule transformée.

Des résultats similaires ont été obtenus dans notre laboratoire par Cazlaris (1989), sur le modèle NIH 3T3 pour lequel la transformation de la cellule par l'oncogène ras conduit de la même façon à une augmentation des activités sialyltransférasiques.

Par ailleurs, au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence certaines modifications de la sialylation de la surface cellulaire. En effet, nous avons pu observer une augmentation de la proportion de Neu5Gc à la surface de cellules transformées par l'oncogène ras.

Les acides sialiques constituent une famille d'environ 30 membres. Cette grande diversité repose sur les différentes possibilités de substitution des groupements hydroxyliques de l'acide N-acétylneuraminique (Schauer 1982).

Les deux types d'acides sialiques les plus répandus sont le Neu5Ac (Acide N-acétylneuraminique) et le Neu5Gc (Acide N-glycolylneuraminique). Le Neu5Gc est très répandu dans le règne animal et selon le tissu et les espèces, il constitue une proportion importante des acides sialiques liés aux glycoconjugués. Par exemple, il constitue plus de 90% des acides sialiques liés aux glycoprotéines sériques chez la Souris ainsi qu' aux mucines de glandes sous-maxillaires de Porc. Toutefois, il est notable que chez certaines espèces, le Neu5Gc est totalement absent dans certains organes.

Chez l'Homme, le Neu5Gc n'a pas été détecté dans les tissus sains. Par contre, des études ont pu montrer l'apparition de Neu5Gc dans les glycolipides isolés de tumeurs de colon humain, à raison de 3 % de l'acide sialique total. Ce néoantigène est encore appelé antigène de Hangnutziu-Deicher (Higashi *et al.*, 1985 ; Hirabayashi *et al.*, 1987). Le Neu5Gc a également été caractérisé au niveau de O-glycosylprotéines de tumeurs mammaires de Rat (Sherblom et Dahlin, 1985). De même l'apparition de Neu5Gc a été mis en évidence par Zhu (Thèse 1989) dans des fibroblastes de Souris transformés par l'oncogène ras.

Ces différentes observations nous ont conduit à envisager la possibilité d'une action de l'oncogène ras sur l'expression du gène de l'hydroxylase responsable de la conversion du Neu5Ac en Neu5Gc par hydroxylation du groupement N-Acétyl pour former un groupement N-glycolyl, cette enzyme ayant été récemment caractérisée dans les glandes sous-maxillaires de Porc et le foie de Souris par Shaw et Schauer (1988).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de caractériser une activité hydroxylasique dans les homogénats cellulaires de BHK et de BHKras, dans des conditions de dosage définies par Shaw et Schauer (1988). Cependant, au cours de nos différentes tentatives, nous n'avons jamais détecté d'activité de conversion du Neu5Ac en Neu5Gc dans ces cellules. Il semblerait donc, que l'apparition du Neu5Ac soit le fruit d'un autre mécanisme.

Si la conversion du Neu5Ac en Neu5Gc par l'hydroxylase n'est pas la bonne hypothèse pour expliquer le phénomène observé dans le cas présent, comment expliquer l'apparition de Neu5Gc sur la surface membranaire des cellules transformées ? Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés.

Le milieu de culture contient du sérum de veau foetal (SVF) très riche en glycoconjugués substitués par des résidus acides sialiques et notamment par du Neu5Gc dans des proportions non négligeables (Schauer, 1982).

Nous avons cultivé les cellules transformées en l'absence de SVF, ce dernier étant remplacé par de l'insuline, de la transferrine et des sels de sélénium. Dans ce cas, l'analyse en spectrométrie de masse par fragmentométrie des acides sialiques nous a révélé l'existence exclusive de Neu5Ac, aucun des fragments caractéristiques de Neu5Gc n'ayant pu être identifiés.

Ces résultats sont en faveur d'une "capture" des acides sialiques du milieu de culture par les cellules, soit sous forme libre (après libération sous l'effet de neuraminidases), soit encore associée à la partie glycanique des glycoconjugués.

A cet égard, des travaux menés par Furukawa *et al* (1988), ont permis de montrer, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le Neu5Gc porté par des structures gangliosidiques, dans les tumeurs de colon humain, qu' apparaissait une proportion non négligeable de Neu5Gc liés aux gangliosides, et ce dernier, pouvait provenir d'une capture du Neu5Gc du milieu de culture suivi d'un recyclage au sein de la cellule.

Par ailleurs, l'apparition de Neu5Gc avait été identifié dans la lignée cellulaire Hela S3 par Carubelli et Griffin en 1967, et, en 1973, Hof et Faillard ont mis en évidence que le Neu5Gc provenait du SVF du milieu de culture et qu'il n'était pas synthétisé par la cellule. En effet, quand les cellules étaient cultivées en présence de sérum humain, le Neu5Gc disparaissait de la surface cellulaire (voir la revue de Rosenberg et Shengrund 1976).

Hischberg et Yeh (1977) ont démontré que des cellules en culture (les BHK) étaient perméables à l'acide sialique présent dans le milieu de culture et le réexprimait dans les glycolipides et les glycoprotéines de sa surface. Par ailleurs, des études ont montré que l'acide sialique incorporé dans la cellule ne subirait pas de modifications structurales et serait immédiatement activé sous forme de CMP-Neu5Ac (Schauer, 1982). Des travaux réalisés *in vivo* ont pu confirmer cette observation.

Des recherches similaires effectués avec le Neu5Gc ont pu montrer que les résultats obtenus étaient similaires bien que le pourcentage de capture fût plus faible que dans le cas du Neu5Ac (Schauer, 1982).

Nous pensons donc que le Neu5Gc serait capturé par la cellule et ré-exprimé à sa surface. Ce phénomène de recyclage serait plus important dans les cellules transformées, peut-être par une modification de la perméabilité et de l'endocytose en faveur d'une accumulation importante d'acides sialiques exogènes dans la cellule. Des études plus approfondies sur le transport de l'acide sialique exogène au travers de la membrane des cellules, transformées ou non, seraient nécessaires pour mieux définir les différentes étapes de ce mécanisme.

MEMOIRE III :

**AUGMENTATION DE L'ACTIVITE α -2,6-SIALYLTRANSFERASE
DANS DES FIBROBLASTES DE RAT TRANSFORMES PAR
L'ONCOGENE RAS**

INTRODUCTION

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons choisi pour modèle cellulaire les fibroblastes de Rat (FR3T3) transformés par différents oncogènes dans le but d'étudier les modifications des activités sialyltransférasiques, ceci en fonction de l'oncogène transfectant et du degré de transformation cellulaire. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire d'Oncologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur D. Stéhelin). Les cellules normales et transformées nous ont été gracieusement données par le docteur J. Cornelis et son équipe.

La transformation des FR3T3 avec les oncogènes v-myc et v-src (FRmyc et FRsrc) a été réalisée par infection des cellules avec le rétrovirus murin MMCV-neo (Vennström et al., 1984), portant à la fois l'oncogène et le gène de résistance à la néomycine (Salomé *et al.*, 1990). Les FRras et les FRmyc+ras sont obtenues par transfection avec le plasmide PSV2neo EJ (van Hille *et al.*, 1989) des cellules FR3T3 et des cellules FRmyc respectivement. Les FRBPV1 proviennent de cellules FR3T3 infectées par le virus du papillome Bovin (Meneguzzi *et al.*, 1984), et le FRmT par transfection avec la région transformante du polyome T, MiddleT (Mousset *et al.*, 1986).

Présentation des clones étudiés :

FRneo : Ces cellules nous servent de témoins démontrant que la transfection n'interfère pas avec les phénomènes observés.

FRmyc : L'oncogène viral v-myc^{OK10} provient du virus aviaire OK10. C'est une protéine nucléaire. Il intervient dans la prolifération cellulaire, et son activation induit une immortalisation cellulaire. Les cellules FRmyc n'ont pas le phénotype transformé. La seule différence avec les cellules de référence est qu'elles se divisent plus rapidement.

FRras : L'oncogène c-Ha-ras humain est activé par mutation ponctuelle sur le codon 12. Cet oncogène est impliqué dans les processus de prolifération cellulaire et de différenciation. Son activation conduit généralement à la transformation cellulaire. Les FRras ont un phénotype transformé. Elles sont plus rondes et réfringentes et adhèrent moins au substrat.

FRmyc+ras : La coopération des deux oncogènes myc et ras affecte gravement le métabolisme cellulaire s'il on en juge son aspect morphologique. Ces cellules adhèrent peu au substrat, elles sont rondes et réfringentes et s'agglutinent entre elles pour former des "grappes".

FRsrc : l'oncogène src provient du virus de sarcome de Rous. Comme l'oncogène ras, son activation induit la transformation de la cellule. Les FRsrc ont un phénotype transformé.

FRBPV1 : Le virus du papillome bovin n'induit pas de modifications morphologiques apparentes de la cellule, pourtant ces cellules sont tumorigènes et métastasantes.

FRmT : Le gène transformant du polyome T induit une modification morphologique de la cellule. Les cellules sont transformées.

La tumorigénicité d'une cellule peut être évaluée par sa capacité de se multiplier en milieu gélosé semi-solide ainsi que par la densité de la culture. Ces valeurs sont présentées dans le tableau V page 91.

Les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude sont rassemblés dans le mémoire présenté ci-après et soumis pour publication à J.Biol. Chem..

Tableau V: Caractérisation des cellules étudiées

Lignées cellulaires	Clonage en AGAR (%)	Densité des cellules $\times 10^6$	Phénotype
FR3T3	< 0,1	4	plates
FRneo	< 0,1	4	plates
FRmyc	1	6	plates
FRras	45	31	rondes
FRmyc+ras	nd	nd	rondes
FRsrc	36	13	rondes
FRBPV1	10	15	plates
FRmT	nd	nd	rondes

n.d. : non déterminé

Title page**THE c-Ha-ras ONCOGENE INDUCES INCREASED EXPRESSION OF β -GALACTOSIDE α -2,6-SIALYLTRANSFERASE IN RAT FIBROBLAST (FR3T3) CELLS.**

Nadia LE MARER¹⁺, Vincent LAUDET², Eric C. SVENSSON³, Haris CAZLARIS¹⁼, Benoit VAN HILLE², Christian LAGROU², Dominique STEHELIN², Jean MONTREUIL¹, André VERBERT¹ and Philippe DELANNOY¹.

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

2 : INSERM U 186/ CNRS UA 041160, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

3 : Department of Biological Chemistry, UCLA School of medicine, Los Angeles, CA 90024 USA.

= : Present address : Institut Pasteur Hellenique, 127 Av. Vas. Sofias, GR115 21, Athens, Greece.

+ : To whom correspondance should be addressed at :

INSERM U 186/ CNRS UA 041160, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

Running Title : c-Ha-ras and α -2,6-sialyltransferase activity.

Key Words : α -2,6-sialyltransferase, c-Ha-ras, transformation, sialic acids.

Abbreviations :

ASOR : asialo-orosomuroid (asialo- α_1 -glycoprotein acid)

ASFET : asialo-fetuin

ASSTFgp : glycopeptides of asialo-serotransferrin

Gal- α -2,6-ST : Gal- α -2,6-sialyltransferase

Gal- α -2,3-ST : Gal- α -2,3-sialyltransferase

SNA : *Sambucus nigra* agglutinin

FITC-SNA : Fluorescein-isothiocyanate-*Sambucus nigra* agglutinin

SUMMARY

We have studied the modification of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase activity in Rat fibroblasts cell lines (FR3T3), transformed by various oncogenes such as c-Ha-ras or v-myc. We found that, in contrast to v-myc, c-Ha-ras induces a striking increase of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase activity in FR3T3 cells. Cells transfected with both v-myc and c-Ha-ras did not show an increased enzymatic activity when compared to cells transfected with c-Ha-ras alone.

In order to determine if this increase was correlated with cellular transformation, we test other transforming oncogenes such as v-src, middle T (mT) of polyoma virus, or the transforming BPV1 virus. Surprisingly, we found that none of these oncogenes were able to induce an increase of β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase activity which seems specific to c-Ha-ras transformed cells.

This increase of β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase activity could be correlated with an elevation of the expression of this enzyme since immunofluorescence studies with anti- β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase antibodies revealed a sharp perinuclear signal present in c-Ha-ras transformed cells but absent in control cells. In addition, immunoprecipitation with these antibodies showed that the expression of this enzyme was nearly 3 fold greater in c-Ha-ras transformed cells when compared with reference cells. Moreover, in fluorescence studies with fluorescein labelled *Sambucus nigra* Agglutinin, we detected an increase of Neu5Ac(α 2-6)Gal sequence on membranes glycoproteins in cells transformed by c-Ha-ras oncogene. Finally, we showed by northern blot experiments, that there are increased levels of β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase mRNA in c-Ha-ras transformed cells, confirming the results obtained with antibodies. All these results permit us to conclude that c-Ha-ras induces, in FR3T3 cells, an increase of the expression of the β -Galactoside- α -2,6-sialyltransferase and that this differential expression produces a supplementary terminal α -2,6 sialylation ; The implication of this sialylation change is discussed.

INTRODUCTION

Elucidation of the molecular and cellular changes that accompany malignant conversion of normal cell populations is central to the understanding of cancer. Cell surface carbohydrates display structural alterations concomitant with malignant transformation (1; 2 ; 3 ; 4). Transformation by chemical mutagens as well as by oncogenic viruses results in changes in the size of N-linked and O-linked glycans (1; 5 ; 6). The increased size of their carbohydrate structure had been attributed to multi-antennarisation and to increased sialylation (7). Multi-antennarisation have been well studied and, in particular, has been associated with increased GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)-branching of complex type oligosaccharides. This phenomenon is directly associated with elevated N-Acetylglucosaminyltransferase V activity (8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12). Several recent observations suggested that increased expression of β -1,6- branched oligosaccharides may be required for tumor cell metastasis. When the initiation of the β -1,6- antenna is blocked by inhibitors of glycosylation pathway such as swainsonine, the metastatic capacity of lymphoid tumor cells is reduced (12).

While the multi-antennarisation of N-linked glycans present in transformed cells is widely accepted, the increased sialylation in these cells is not a general phenomenon. Nevertheless, it has been associated with the metastatic potential of transformed cells (13 ; 14). The sialylation pattern observed in cells is dependent of at least two different parameters : (i) the presence of intracellular acceptors and, (ii) the pool of enzymes required for sialylation (15 ; 16 ; 17). These sialyltransferases and other glycosyltransferases such as galactosyl- and fucosyltransferases have been found, to be elevated in the sera of patients with malignant disease (18 ; 19; 20).

Point mutations can convert the cellular ras genes into oncogenes able to transform cultured cells (21 ; 22). Moreover, in numerous types of human cancer, ras activated genes have been detected (23 ; 24 ; 25 ; 26). Mutation of c-ras genes can be associated to progression of human colorectal tumors to a adenoma class II (27). In spite of the known biochemical properties of the ras gene product p21^{ras}, namely GTPase activity (28 ; 29), the molecular mechanisms of action of activated, as well as normal, p21^{ras} in the cell is poorly understood (30). However, p21^{ras} is found associated to a GTPase activating protein (GAP) which may serve as an effector molecule for ras action. Both proteins are implicated in the pathways governing signal transduction and cellular growth.

In vitro transfection of cells with an activated ras gene can induce the same

glycosylation modifications as those observed in tumor cells (5 ; 31). Multiantennarisation, alteration of glycolipids and, more recently, increase of the N-acetylglucosaminyltransferase V activity have been described and correlated with metastatic potential of ras transformed cells (10 ; 32).

The aim of the work presented in this paper, was to study the effect of various oncogenes such as c-Ha-ras and v-myc on the activity of β -galactoside sialyltransferases. We show that c-Ha-ras induces an increase of the activity of the β -galactoside α -2,6-sialyltransferase but not of the β -galactoside α -2,3-Sialyltransferase. In addition, we find that other oncogenes such as v-myc, v-src, polyoma virus middle T (mT) or the transforming Bovine Papilloma Virus 1 (BPV1) cannot enhance Gal- α -2,6-ST activity. This increased activity has an impact on the sialylation at the cell surface. We demonstrated that this ras-mediated enhancement is caused by an increase of the enzyme level and of the mRNA encoding Gal- α -2,6-ST.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Chemicals :

All reagents were of analytical grade, CMP-[U ¹⁴C]-Neu5Ac (262 mCi/mmol; (9,6 GBq/mmol)) and L-[³⁵S]-methionine (800 Ci/mmol ; (29,3 TBq/mmol)) and were purchased from Amersham Labs (Amersham, U.K.). Immunoprecipitin (Protein A-Sepharose), fluorescein isothiocyanate (FITC), CMP-Neu5Ac, 2,3-dehydro-2-deoxy-Neu5Ac and fetuin were purchased from Sigma Chem. Co. (St Louis, USA). Orosomuroid (α_1 -acid glycoprotein) were purified from human serum (33). *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) was prepared according to Broekaert *et al.*(34), and was kindly supplied by F. Delannoy. The monoantennary oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc was prepared according Michalski *et al.* (35) and was a kind gift of D. G. Strecker and D. J.C. Michalski and the glycopeptides of human serotransferrin, prepared by extensive Pronase digestion, were kindly supplied by Prof. G.Spik (from our laboratory) (36).

Buffers :

The composition of commonly used buffers is described below.

PBS : 10mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃ ;

TNE-Apro : 10mM Tris/HCl pH 7.4, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1% aprotinin.

RIPA-Apro : TNE-Apro, 1% Triton X100, 0.5% sodium deoxycholate, 0,5% SDS.

SSC : 15mM sodium citrate, 0.15M NaCl.

Gel sample buffer : 20% glycerol (v/v), 2% β -mercaptoethanol, 5% SDS, 0.001% bromophenol blue, 0.3M Tris/HCl pH 8,9.

Guanidinium buffer : 4.7M guanidinium thiocyanate, 20mM sodium acetate, 0.5% sodium sarcosinate, 50mM Tris/HCl, 0.1M β -mercaptoethanol.

Cushion cesium : 5.7M CsCl, 0.25M sodium acetate.

Cell lines :

Transformed derivatives of FR3T3 cells (37) were previously characterized. Transformation of FR3T3 with the v-myc and v-src oncogenes (FRmyc and FRsrc) were performed by infection with the murine retrovirus MMCV-neo (38), carrying both the avian

v-myc^{OK10} (FRMC14 clone in ref. : 39) or the avian v-src oncogene (FRSR13 clone in ref. : 40) and the neo gene. Transformation of FR3T3 with ras (FRras, FREJ4 clone in : 40) and super-transformation of FRmyc with ras (FRmyc+ras) were performed by transfection with pSV2neoEJ. FRBPV1 was obtained by transfection of the Bovine Papilloma Virus 1 genome by G. Meneguzzi (FRBP8 clone in ref : 39), and FRmT by transfection with the Polyoma Virus middle T antigene (41). As a control we also use G418 selected FR3T3 cells which were transfected with the pSV2-neo plasmid harboring the gene coding for resistance to the neomycine (FRneo).

Cell culture :

FR3T3 and its transformed derivatives were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) with 10% foetal calf serum (Aseptic serum, Gibco). All cultures, were performed on Falcon plastic petri dishes or flasks, at 37°C, in a humid atmosphere of 5% CO₂ in air. Cells were passaged every 3 days by trypsinization. Confluent cultures were harvested by scraping in PBS.

Sialyltransferases assays :

Preparation of cell homogenates :

Cells were harvested at confluency, washed three times in cold PBS and scraped off in the same buffer. They were centrifuged at 1,500 x g for 5 min and washed twice in 25 mM sodium cacodylate pH 6.5, 0.15M NaCl buffer. Pellets were resuspended in the same buffer supplemented with 1% Triton X100 and 20 % glycerol and homogenized at 4°C. The insoluble particles were removed by centrifugation and 10,000 x g for 30 min at 4°C. Supernatants were either used immediately for the assays or kept frozen at -70°C. The protein concentration were determined according to Bradford (42).

Preparation of the acceptors :

Fetuin, orosomuroid and glycopeptides of human serotransferrin were desialylated by mild acid hydrolysis with 0.1N H₂SO₄ at 80°C for 1 h. Sulfuric acid and Neu5Ac were eliminated by extensive dialysis against distilled water for the glycoproteins, and by gel filtration for the

glycopeptides. To confirm total desialylation, sugar analysis was carried out by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation.

Sialyltransferases assays :

All the sialyltransferase assays were performed at least in duplicate. The standard enzyme reaction mixture contained, 50 μ l of cell homogenates, 0,69 nmol of CMP-[U-¹⁴C]-Neu5Ac (4.4×10^5 dpm), 25 nmol of non-radioactive CMP-Neu5Ac (final concentration : 0,25mM), 1 mM 2,3 dehydro-2-deoxy-Neu5Ac as inhibitor of neuraminidase, sodium cacodylate 25mM, NaCl 0,15M, pH 6.5 buffer and acceptor to a final concentration of terminal galactose residues of 2.0 mM, in final volume of 100 μ l. All the reaction were performed at 37°C.

For asialo-glycoproteins acceptors, the reaction was stopped by addition of 1 ml of ice-cold 5% wolframophosphoric acid in 2N HCl. Samples were washed on glass fibers filters, twice with 5% trichloroacetic acid, water and ethanol (43). After drying, filters were processed for radioactivity counting. For glycopeptides or oligosaccharides acceptors, the reaction was stopped by boiling for 10 min to destroy the excess of CMP-Neu5Ac. After centrifugation, sialylated products were separated from Neu5Ac by descending paper chromatography on Whatman 3M with the following solvent : pyridine/ethyl acetate/acetic acid/H₂O (5:5:1:3, v/v), over 24 hours, in the case of glycopeptides or 3 days for the monoantennary oligosaccharides in order to separate both isomeric derivatives.

Fluorescence microscopy :

Visualisation of Neu5Ac(α 2-6)Gal sequence on the cell surface with SNA-FITC

Preparation of SNA-FITC : 50 μ l of a solution of 1 mg/ml FITC in dimethyl sulfoxide was added to 1 ml of 2 mg/ml of SNA in 0.1M sodium carbonate pH 9. The solution was incubated during 8 hours at 4°C under continuous stirring, then incubated with NH₄Cl 50 mM for 2 hours at 4°C. Then, xylene cyanol and glycerol were added to a final concentration of 0.1% and 5% respectively. The unbound dye were separated from the conjugate by extensive dialysis against PBS at 4 °C for 3 days. The ratio of fluorescein to protein was estimated by measuring the absorbance at 490 nm and 280 nm.

Preparation of cells : Cells were plated onto 12 mm glass coverslips. At 50 %

confluence, cells were fixed with freshly prepared *para*-formaldehyde 4% in PBS for 1 hour at 20°C and blocked with 50 mM ammonium chloride in PBS for 30 min at 20°C. FITC-SNA at a concentration of 25 µg/ml in PBS alone or with 40 µg/ml of orosomuroid as a competitor was used for incubation of the fixed cells for 30 min at 20°C. Cells were rinsed with PBS and mounted in glycerol.

Visualisation of the β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase with Rabbit antibodies anti β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase

Cells were prepared according to the previous method except they were permeabilised with acetone 100 % at 4°C during 15 min, then rinsed with PBS and water. Coverslips were rinsed with gelatin 0.2 % in PBS. 100 µl of diluted sera of antibodies 1/100 was incubated with permeabilised cells during 24 hours at 4°C. The cells were rinsed with PBS and incubated for 2 hours with Mouse antibodies anti Rabbit IgG. Photographs were prepared using a Zeiss universal research microscope.

Immunoprecipitation of β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase.

Cells were incubated for 2 hours in the presence of 80 µCi/ml of [L-³⁵S]methionine, lysed and immunoprecipitated with rabbit anti- β -galactoside α -2,6-sialyltransferase antibodies under classical procedures. The antiserum was purified on Gal- α -2,6-ST affinity column before use (44).

Northern analysis :

The cDNA encoding Rat β -galactoside α -2,6-sialyltransferase was a generous gift of J.C. Paulson. The 1.6 kbp insert of the plasmid pECE-ST3 (44) was labelled by nick translation according to the method of Maniatis *et al.* (45). Extraction of RNAs and Northern blot experiments were realized under classical procedures (45).



RESULTS

The cells used have been previously characterized (39 ; 40). Briefly, the FR3T3, FRneo and FRmyc harbor a normal fibroblast morphology : the cells are flat, largely adherent to the dish and show contact inhibition (fig.1 page 100). Nevertheless, the FRmyc clone has a low but detectable cloning efficiency in agar (39). FRras are morphologically transformed consisting of small fusiform cells showing a criss-cross organization which form colonies in soft agar (40). FRmyc+ras were highly transformed, rounded and poorly adherent to the dish (fig.1 page 100). These last cells exhibited a high cloning efficiency in soft agar (S. Mousset *et al.*, personal communication).

Sialyltransferases assays :

The degree of transformation of FR3T3 cells obtained by the action of different oncogenes is a useful biological tool to evaluate the impact of oncogene expression on glycosyltransferases activity. Different sialyltransferases vary in their activity according to the type of glycan acceptors. Fetuin avoids three tri-antennary complex type chains or three O-linked chains (Nilsson, 1979). Asialo-fetuin (ASFET) may therefore serve as an acceptor for the different sialyltransferases acting either on N- and O-linked chains of glycoproteins. In a first round of experiments, the global activity of sialyltransferases was determined in cellular extracts (fig. 2 page 101). The kinetics of sialyltransferase activities on this acceptor (fig. 3A page 102) did not reveal obvious modifications of activity between the different cells used. In contrast, kinetics assays on asialo-orosomuroid (ASOR) which contains only N-linked glycans, five tri- and tetra-antennary complex type chains (fig.2 page 101), showed a meaningful increase exclusively in ras transformed cells (fig.3B page 102). The apparent capacity of the different cellular homogenates to transfer Neu5Ac onto ASOR and ASFET glycoproteins is expressed as average values in Table 1 (page 103). Whereas the capacity of transfer on ASFET is virtually identical in all the cellular extracts, there is a striking difference between ras transformed cells and normal cells when we used ASOR which contains exclusively N-acetylglucosaminic structures. These results suggest that the activity of enzymes implicated in N-linked glycans sialylation is increased in ras transformed cells.

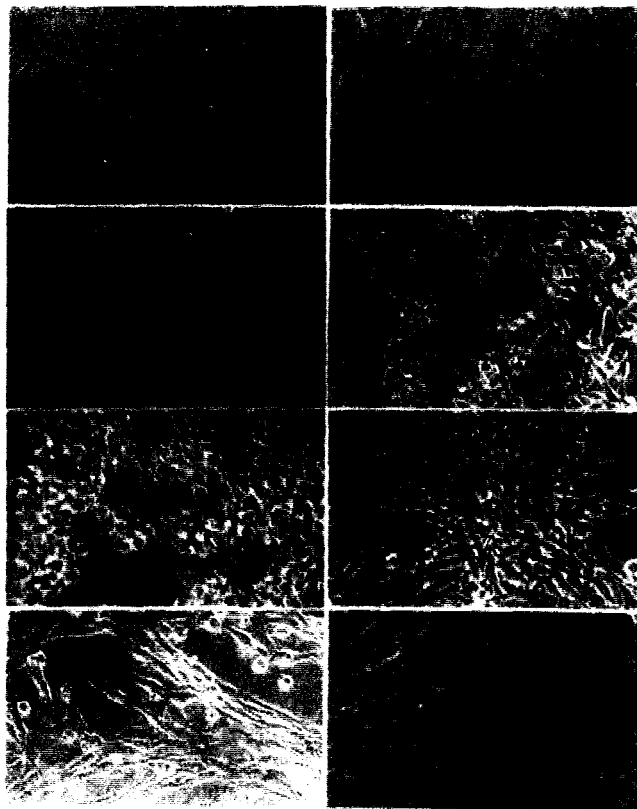


Figure 1 : Morphological appearance of normal and transformed Rat fibroblast cells. Phase-contrast microscopy of cells in culture representing : FR 3T3 (A), FR neo (B), FRmyc (C), FRras (D), FR myc+ras (E), FRsrc (F), FRmT (G) and FRBPV1 (H). (Magnification X 640).

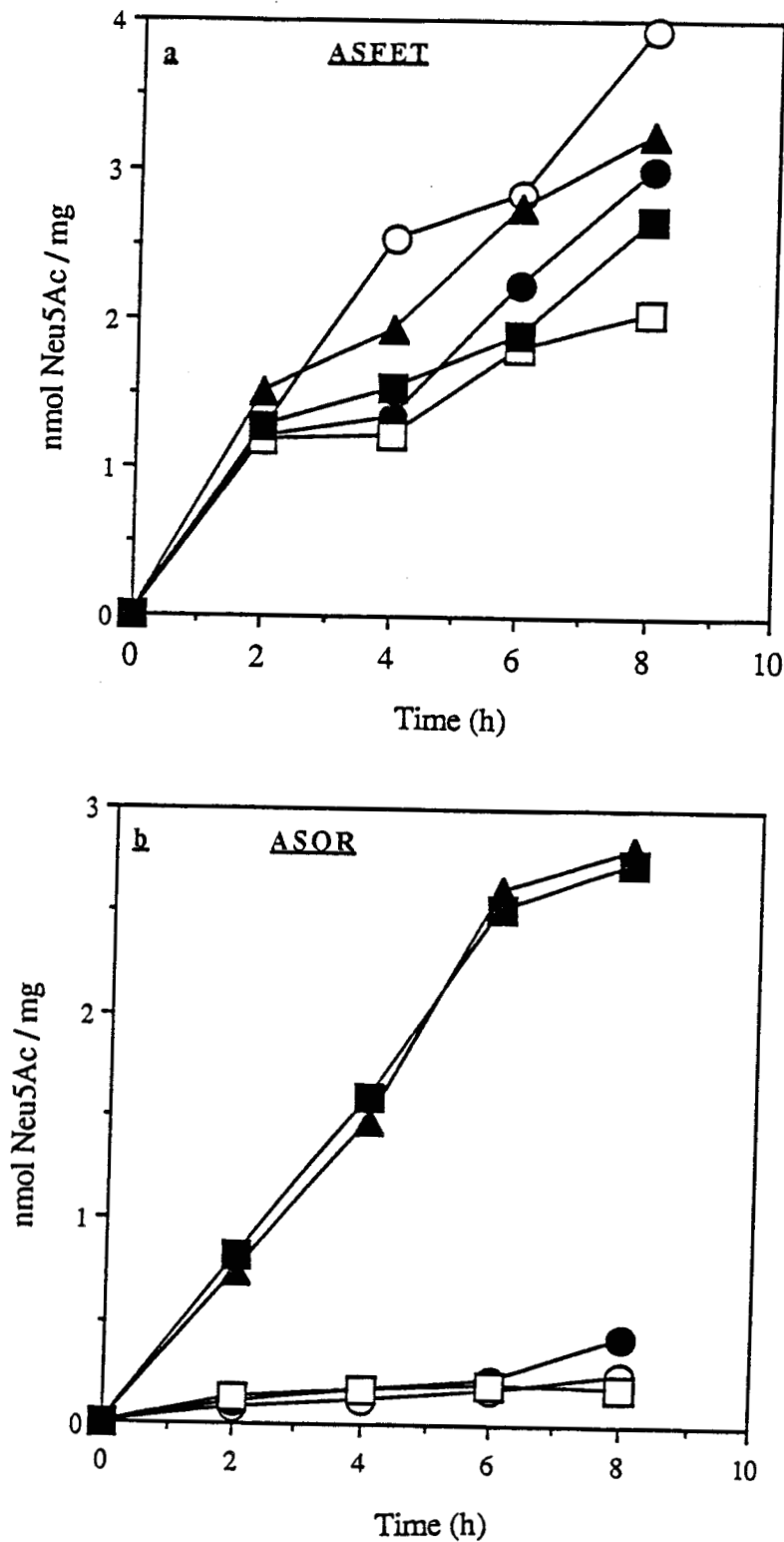


Figure 3 : Kinetics of sialyltransferases activity in FR3T3 cells and its transformed derivatives using ASFET (a) and ASOR (b) as acceptor.

Cellular extracts of cells were incubated in cacodylate buffer pH 6.5 at 37°C in the presence of acceptor at a concentration calculated to obtain 2mM of terminal galactose residues. Aliquot fractions were taken off from the incubation mixture at various times, precipitated with 1 ml of wolframophosphoric acid at 5% in HCl 2N and processed as described in "experimental procedures" section. the proteins were precipitated, filtrated, rinsed and dried before quantification of the radioactivity. The capacity of transfer of the cellular homogenates is expressed in nmol of Neu5Ac/mg of protein. ○, FR3T3 ; ■, FRneo ; □, FRmyc ; ●, FRras ; ▲, FRmyc+ras.

Table I : Sialyltransferase activity measured in cellular homogenates of FR3T3 cells and its transformed derivatives using asialo-glycoproteins as acceptors, respectively ASFET and ASOR containing 2 mM of Gal terminal. Transfer capacity of the different cell lines toward both acceptors is expressed in nmol of Neu5Ac transferred per mg of proteins contained in the cellular homogenates and per hour as an average value of two experiments.

CELLS	nmol Neu5Ac / mg . h	
	ASFET	ASOR
FR3T3	0,612	0,040
FRneo	0,595	0,055
FRmyc	0,585	0,065
FRras	0,635	0,412
FRmyc+ras	0,757	0,387
FRsrc	0,255	0,165
FRBPV1	0,305	0,065
FRmT	0,416	0,062

In order to determine whether the modulation of the specificity of these sialyltransferases activity for N-linked glycans can explain this variation, we determined the apparent K_m and V_m with variable concentration of glycopeptides of asialo-serotransferrin (ASSTFgp) containing exclusively biantennary glycans (fig.2 page 101). As indicated in fig.4 page 105, transformed cells showed that both the apparent K_m and the V_m values vary : the apparent K_m was 3 fold lower and the V_m around 5 fold higher when compared with those of non-transformed cells. The apparent capacity of the different homogenates to transfer Neu5Ac on ASSTFgp was expressed as the ratio V_m/K_m in Table II page 106. FRras and FRmyc+ras exhibited the same increase of activity.

Two enzymes are commonly described to catalyze the transfer of sialic acid to N-linked glycans : the β -galactoside- α -2,6- and the β -galactoside- α -2,3-sialyltransferases. To compare both activities, we chose a monoantennary oligosaccharide as acceptors of sialyltransferases (fig. 2 page 101). After a 6 hours incubation of cellular extracts with this mono-antennary oligosaccharide we separated the two products of the reaction which differ in the linkage of sialic acid (Neu5Ac(α 2-6)Gal-R and Neu5Ac(α 2-3)Gal-R) by descending paper chromatography. The experiment was done on the three cell lines FR3T3, FRras and FRmyc+ras. Figure 5 (page 107) shows the results obtained with FR3T3 and FRras. The profile obtained with FRmyc+ras was similar to that obtained with FRras (Data not shown). It confirms that the capacity of transfer of Neu5Ac on N-Acetyllactosamine type glycans is obviously increased in FRras and FRmyc+ras. On the other hand, the ratio between the activities of both sialyltransferases are clearly different. Effectively, the ratio of activities of Gal- α -2,6-ST / Gal- α -2,3-ST is 0.3 for FR3T3 cells and 7.1 for FRras and FRmyc+ras. All these results confirmed that the transformation of the FR3T3 by either ras or myc+ras induce an increase of the activity of the Gal- α -2,6-ST whereas the Gal- α -2,3-ST is not greatly affected.

Increase of the activity of Gal- α -2,6-ST in ras-transformed FR3T3 cells correlate with the increase of NeuAc(α 2-6)Gal- sequence on membrane cell glycoproteins.

In order to determine if the differential activity of Gal- α 2,6-ST and Gal- α 2,3-ST in FR3T3 transformed by the ras oncogene induces modifications of the sialylation of membrane glycoproteins, *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) was used. SNA recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal sequence with 50-100-fold higher affinity than the Neu5Ac(α 2-3)Gal sequence

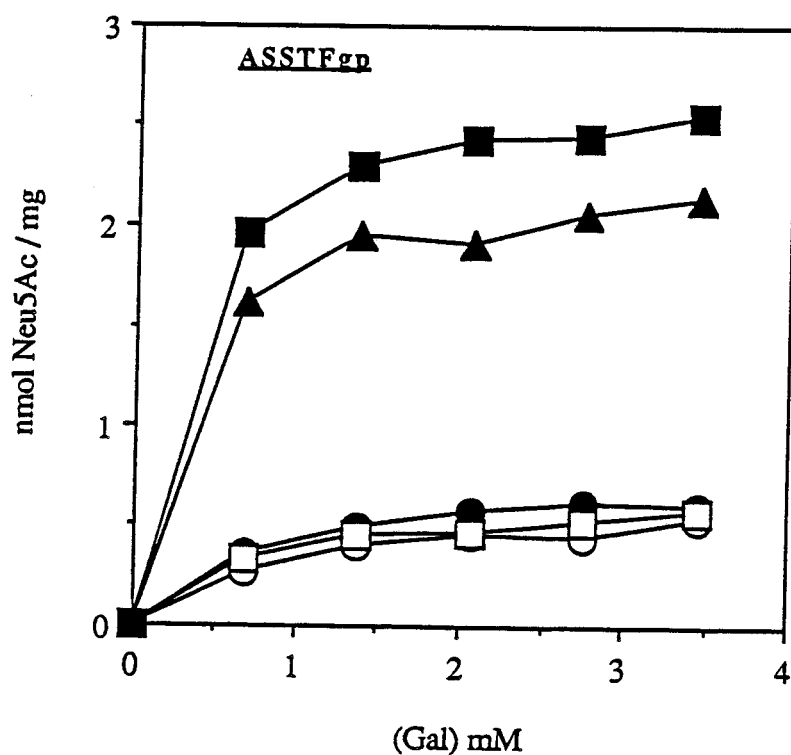


Figure 4 : Influence of asialo-serotransferrin glycopeptide (ASSTFgp) concentration of cellular homogenates of FR3T3 cells and its transformed derivatives. Incubation was performed in cacodylate buffer pH6.5 at 37°C for 4 hours with variable concentrations of ASSTFgp. The reaction was stopped by boiling for 10 min and the samples were processed as described in "Experimental procedures". The values are expressed in nmol of Neu5Ac/mg of protein. V_m and apparent K_m values, summarized in Table II, were determined by analysis of double reciprocal $1/V$ vs $1/S$ plot. ○, FR3T3 ; ■, FRneo ; □, FRmyc ; ●, FRras ; ▲, FRmyc+ras.

Table II: Kinetics parameters of sialyltransferase activity measured in cellular homogenates of FR3T3 cells and its transformed derivatives using ASSTFgp as acceptor. Values of apparent Km and Vm were obtained by analysis of double reciprocal plots of data shown in Fig.4.

CELLS	Km (mM)	Vm (nmol / mg . h)	Vm / Km
FR3T3	0,89	0,16	0,18
FRneo	0,71	0,19	0,26
FRmyc	0,70	0,17	0,24
FRras	0,27	0,68	2,52
FRmyc+ras	0,27	0,56	2,09

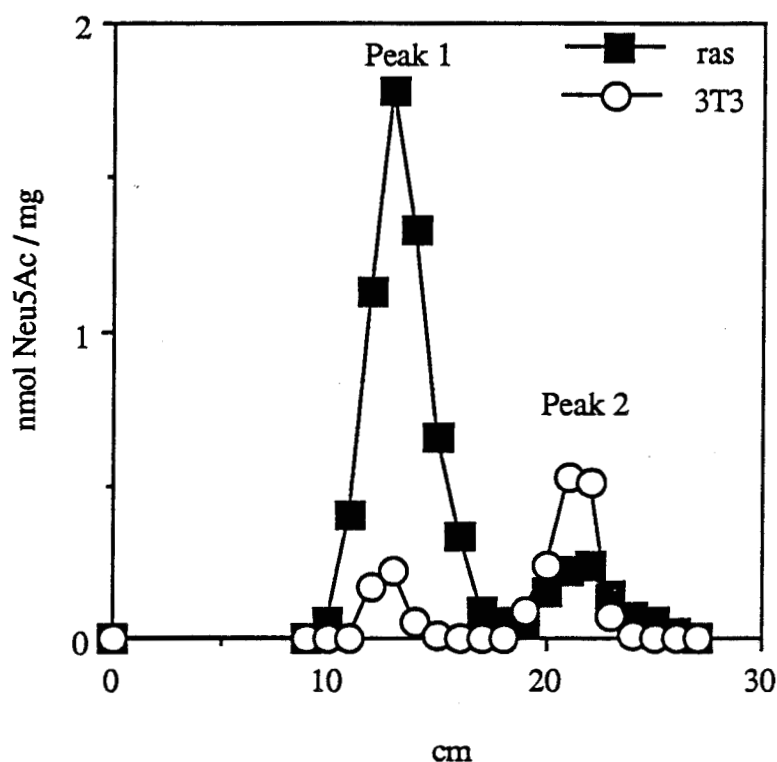


Figure 5 : Descending paper chromatography profiles of the [^{14}C]-Neu5Ac labelled mono-antennary oligosaccharides.

The [^{14}C]-sialylated oligosaccharides were obtained by incubation of FR3T3 and FRras cellular homogenates in cacodylate buffer pH6.5 at 37°C for 6 hours with 2mM of Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc (See experimental procedures for details).

Peak 1 corresponds to the Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc and Peak 2 to the Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc .

○, FR3T3 ; ■, FRras.

(46) and was a very useful and sharp tool to look at differential activity. SNA-FITC revealed a striking increase of fluorescence on cell membrane of cells transformed by ras as well as myc+ras whereas this fluorescence was weak in FR3T3 and in other cells lines exhibiting a normal activity of Gal- α 2,6-ST (figure 6 page 109 and data not shown). Furthermore, western blotting experiments performed with SNA-¹²⁵I showed an increase of the labelled membrane glycoproteins (data not shown). These results largely confirm our *in vitro* observations on the increased Gal- α 2,6-ST activity : the signal obtained with SNA-FITC in immunofluorescence experiments performed on ras-transformed versus normal cells is very strong. Indeed, there is almost no signal in control cells. This difference is bigger than the difference seen during the measurement of Gal- α -2,6-ST activity (see the discussion section).

No correlation between the transformed phenotype and the Gal- α -2,6-ST activity.

Then, we addressed the question whether this phenomenon could be correlated with the transformed phenotype of the various FR3T3 cells. We have tested the Gal- α -2,6-ST activity of FR3T3 transformed by other transforming oncogenes as v-src, BPV1 or Polyoma middle T. Surprisingly, we didn't find any differences in activity from these transformed cells for ASOR as acceptor suggesting that the Gal- α -2,6-ST activity was not elevated in these cells (Table I page 103). So, we could demonstrate that, in this cellular system, c-Ha-ras but not v-myc, v-src, BPV1 and mT, induced an increase in Gal- α -2,6-ST activity which is not therefore a transformation induced phenomenon but the consequence of the biochemical activity of activated c-Ha-ras in these cells.

Nevertheless, the possibility remained that, in the particular clone of FRras used, the Gal- α -2,6-ST activity was elevated for a reason independant of the action of ras. Thus, we have tested several independent clones of FR3T3 transformed by the human c-Ha-ras (FREJ1, 2 and 3 in ref 40) which exhibit no significative differences in the expression of the ras-encoded p21. These clones displayed the same increased activity as the original FRras used (FREJ4 in ref 40) (data not shown). Furthermore, the FRmyc+ras have the same increased Gal- α -2,6-ST activity as our original FRras but derive from another FRmyc clone which was super-transformed by the addition of c-Ha-ras (see "experimental procedures"). Consequently, we can assume that the increase of Gal- α -2,6-ST is a specific effect of the expression of the p21^{ras} oncoprotein.

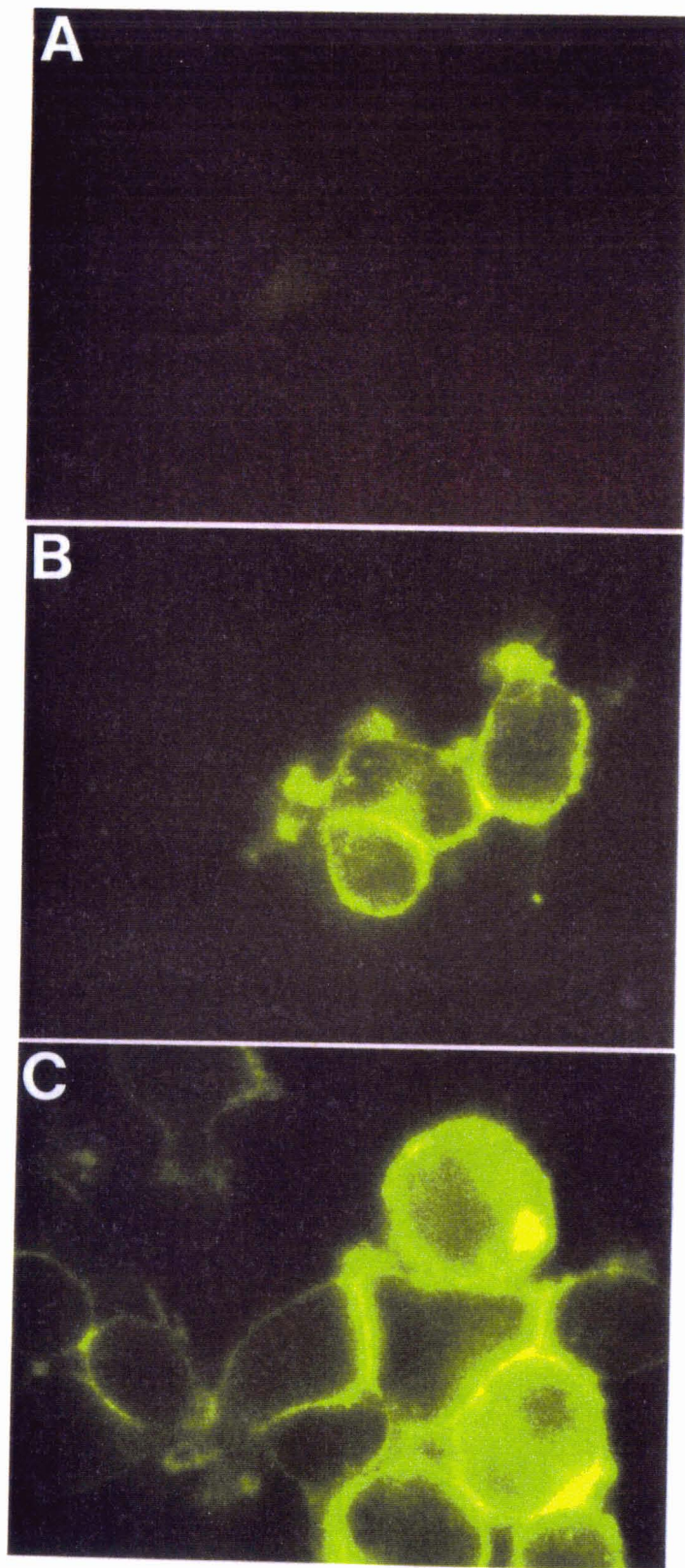


Figure 6 : Detection of Neu5Ac(α 2-6)Gal sequence on the cell surface of FR3T3 (A), FRras (B) and FRmyc+ras (C) cells. Cells were fixed and incubated with SNA-FITC, lectin specific for binding on NeuAc(α 2-6)Gal sequences. The photographs indicate an meaningful surface fluorescence on ras-transformed cells (B and C) whereas the signal is very weak in FR3T3 cells (A).

The increased Gal- α 2,6-ST activity correlates with an higher amount of Gal- α 2,6-ST protein linked to an increase of the steady state level of the correspondent mRNA.

We chose two strategies to determine if the level of the expression of the Gal- α 2,6-ST enzyme in these cells correlated with the results obtained in enzymatic assays. In a first round of experiments, we tested the amount of the enzyme using Rabbit anti-Gal- α -2,6-ST antibodies and secondly, we studied by northern blot the mRNAs encoding Gal- α -2,6-ST.

The presence of the enzyme was monitored by immunofluorescence with rabbit anti-Gal- α -2,6-ST antibodies on permeabilised cells and is presented on the figure 7 page 111. We can detect a sharp perinuclear cytoplasmic signal in ras transformed cell (FRras and FRmyc+ras) and a low signal in FR3T3.

The level of the expression of the enzyme was also determined by immunoprecipitation using the same antibodies with L-[³⁵S] methionine labeled FR3T3 and FRmyc+ras cells. The results of the immunoprecipitation are shown in fig.8 page 112. We can see a 44 kDa band which fits with the known size of Gal- α -2,6-ST (48). The signal we observed was, as expected after the immunofluorescence study, more strong in FRmyc+ras when compared with FR3T3. It became obvious, that the enzyme was present in higher quantities in ras transformed cells compared with FR3T3 cells. Thus, the increased Gal- α 2,6-ST activity observed in ras-transformed FR3T3 may be attributed, at least in part, to an elevation of the number of enzyme molecules present in the cells.

The increased Gal- α -2,6-ST level may be explained by an increased level of Gal- α -2,6-ST encoding mRNA or eventually by a regulation of protein synthesis or turnover. To address this question we tried to visualize the mRNA corresponding to Gal- α -2,6-ST. A northern blot performed with total RNA from FR3T3, FRras and FRmyc+ras was hybridized with a Gal- α -2,6-ST cDNA probe (48). A mRNA species with the expected size of 4.7 kb was detected only in ras-transformed FR3T3 cells with a signal intensity slightly higher in FRmyc+ras than in FRras. The signal was extremely low, but detectable, in FR3T3 or FRneo (fig.9 page 113) and data not shown). To confirm the specificity of the signal, we tried to detect the Gal α 2,6 ST mRNA in Rat liver RNA preparation where the Gal- α -2,6-ST activity is known to be high. As expected, we detected a band at the same size than in the various FR3T3 cells we used. These

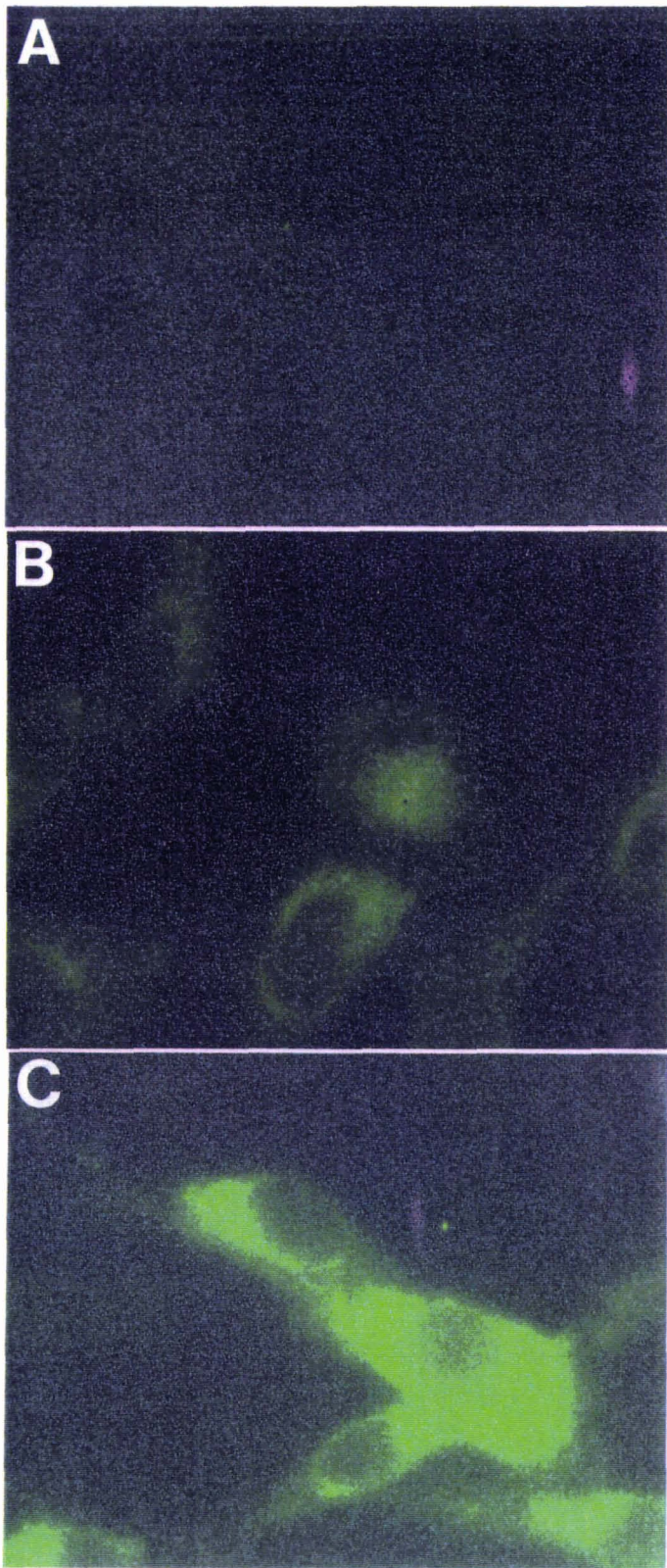


Figure 7 : Detection and localization of Gal- α -2,6-ST by immunofluorescence in fibroblast cells FR3T3 (A), FRras (B) and FRmyc+ras cells (C). Cells were permeabilized and incubated with Rabbit polyclonal antibodies anti- Gal- α -2,6-ST (serum diluted 1 : 200). Magnification (X 640).

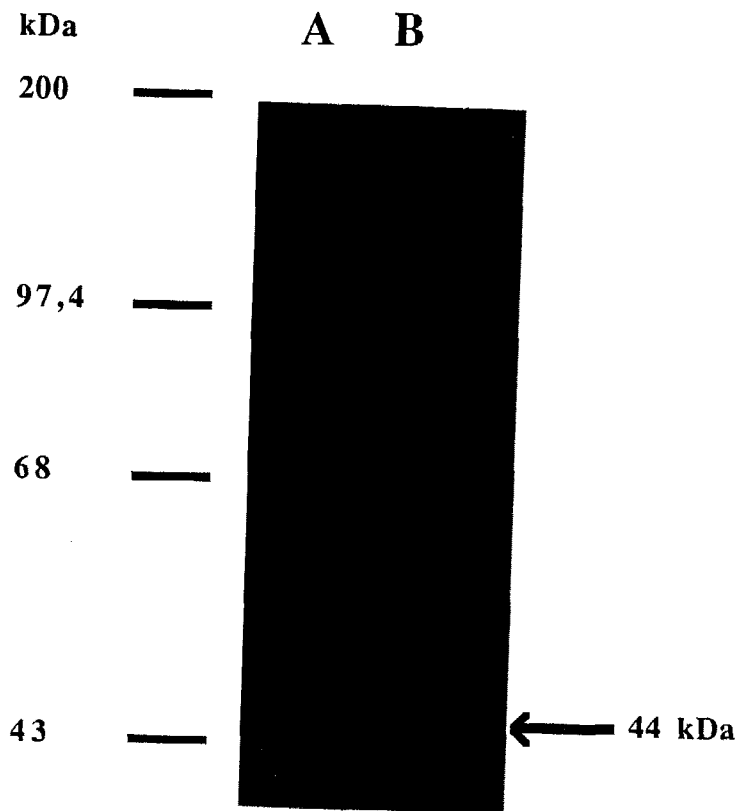


Figure 8 : Immunoprecipitation of [^{35}S]-labelled Gal- α -2,6-ST protein from normal cells FR 3T3 and ras-transformed cells FRras. Antibodies and immune complexes were adsorbed to protein-A Sepharose, collected by centrifugation, solubilized with gel sample buffer, and subjected to SDS-Gel electrophoresis. The [^{35}S]-labelled Gal- α -2,6-ST protein was detected by autoradiography. Additional details are given under "experimental procedures". The result shows an large increase of the quantity of this protein in ras-transformed cells (lane B) compared with normal cells FR3T3 (lane A).

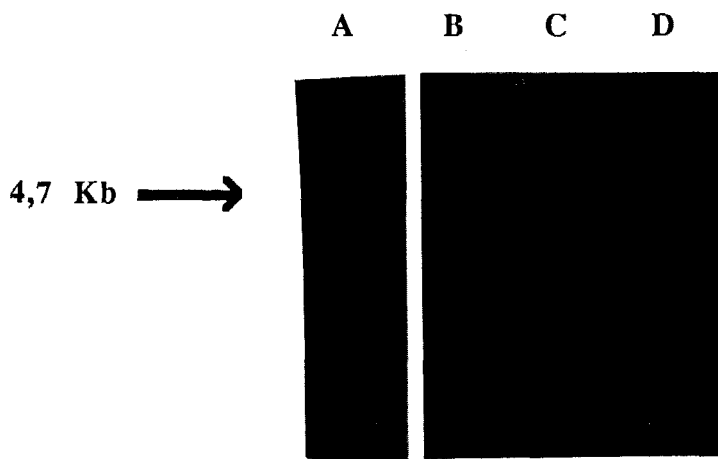


Figure 9 : The ST3 cDNA probe hybridizes to a single fibroblast cells mRNA of 4.7 Kbp highly expressed in ras-transformed cells (FRras). Northern blot analysis of total RNA probed with nick-translation ST3, 1.6kb cDNA containing the complete coding Gal- α -2,6-ST sequence, reveals a single hybridation band corresponding to an mRNA of approximately 4.7 kb in RNA of the liver (A), FRras (B), FRmyc+ras (C) and a very weak signal with FR3T3 (D).

results, confirm that the increase in protein level correlates with an increase in the accumulation of the corresponding mRNA probably due to an increase in the transcription.

DISCUSSION

In this report, we describe that Rat fibroblasts (FR3T3) transformed by c-Ha-ras show a striking increase in Gal- α -2,6-ST activity, which, at least in part, appears to be due to an augmentation in enzyme level. Two essential observations have been made. First, the effect is induced by the c-Ha-ras oncogene but not by the other transforming oncogenes tested. Second, the increase of the Gal- α 2,6-ST activity has a dramatic impact on cell surface sialylation.

Results obtained from the apparent capacity of transfer of sialic acid, using different concentration of biantennary glycans of asialo-serotransferrin (Table II) suggest that the differences observed in the apparent V_m values, among all the cell types, are most likely due to an increase of the number of active molecules (sialyltransferases), specific of N-glycans type, in ras transformed cells. Likewise, The variation of K_m could be probably due to a change in the ratio of the enzymes, Gal- α 2,6-ST and Gal- α 2,3-ST. We know that ASSTF is a best acceptor for the Gal- α 2,6-ST than for the Gal- α 2,3-ST (57 ; 58 ; 59). If the apparent K_m decrease in ras-transformed cells, that means an increase of affinity for the substrat ; so we deduced a probable increase of Gal- α 2,6-ST activity. These deductions have been confirmed, firstly by using mono-antennary glycans (fig. 5) which permit us to indentify an increase of activity of this sialyltransferase, and then by immuno-precipitation and Northern blot, we confirmed an increase of the expression of the Gal- α 2,6-ST in ras-transformed cells (FR_{ras} and FR_{myc+ras}).

The modification of the ratio of sialyltransferases in ras-transformed versus normal FR3T3 cells and, particularly Gal- α -2,6-ST and Gal- α -2,3-ST induces a modification of cell surface sialylation. These results correlate with recent studies (49 ; 50 ; 44) which show that the regulation of the biosynthesis of terminal glycosylation depends on the regulation of the expression of these enzymes and, more specifically, in our case, of those responsible of sialylation. Nevertheless, using SNA-FITC, we observe a large difference in cell surface sialylation, between transformed and control cells. The difference observed with this technique seems higher than that observed with other biochemical parameters, i.e. activity, protein and mRNA quantitations. A precise quantitation of these differences is difficult since experimental conditions are very different

and not directly comparable. The differences due to the fact that measurement of activity was carried out *in vitro* whereas cellular sialylation is an *in vivo* observation. In this latter case, the intra-cellular environment may regulate sialyltransferase activity which can be different from the *in vitro* activity tested in our assays. Indeed, competition for substrates and interactions between glycosyltransferases may play an important role which may account for the dramatic increase of Neu5Ac(α 2-6)Gal sequence we see on glycoproteins of cell membrane.

Surprisingly the phenomenon we observed seems restricted to the ras oncogene. Indeed, with the other oncogenes tested (v-myc, v-src, polyoma middle T and BPV1) we did not see any enhancement of Gal- α -2,6-ST activity. Furthermore, we have detected no difference in the cell membrane sialylation pattern, after visualization by SNA-FITC, in cells transformed with these genes when compared to control cells (FRneo or FR3T3). This result showed that the increase of Gal- α 2,6-ST level is not correlated with cell transformation but was induced specifically by the c-Ha-ras oncogene. This was not expected since numerous reports have associated modifications of cell surface glycoconjugates, such as multi-antennarisation to the transformed phenotype of the cell but not to the biochemical action of the transforming oncogene. The c-Ha-ras oncogene can induce a modification of glycosyltransferase expression. Bolscher *et al.* (32) have recently described glycosylation modifications in NIH3T3 cells transiently transfected by this oncogene. Moreover, these alterations were present before the apparition of the transformed phenotype, suggesting that the p21^{ras} may induce transformation by modulation glycosylation mechanisms. Bolscher *et al.* also propose that the modifications of glycosylation are not a direct consequence of transformation. This observation, although obtained in a different system, fit well with our results. The Gal- α -2,6-ST have been cloned by Weinstein *et al.* (48) (EC 2.4.99.1). Much informations are actually described concerning the organisation of Gal- α -2,6-ST gene and its transcriptional regulation (51 ; 52).

How does the ras oncogene regulate the Gal- α -2,6-ST level in Rat fibroblast cells, such as FR3T3 ? The mechanism of action of the p21^{ras} is always under scrutiny but p21^{ras} is known to interfere with the intricate pathways governing cellular proliferation. ras activity is dependent on a correct anchoring of the protein in cell membrane via a lipidic anchor. Moreover, the normal p21^{ras} is known to interact with the GAP protein to increase its GTPase activity. The ways by which ras may modulate Gal- α -2,6-ST level remain elusive but it is highly probable that ras acts in an indirect manner inducing a cascade of events leading to this increased enzyme

activity. Some reports have shown that ras is able to indirectly regulate gene expression, either positively or negatively, at the transcriptional level (53 ; 54). In our case, although we can see a clear increase of Gal- α -2,6-ST mRNA level we have no evidence suggesting whether ras regulate Gal- α -2,6-ST gene expression or its mRNA turnover. Work is in progress in our laboratory to test how ras may achieve this regulation which leads to important physiological consequences for the cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. James C. Paulson for generous gift of anti-Gal- α -2,6-ST antibodies, Prof. Geneviève Spik, Doctor Gérard Strecker and Frank Delannoy for giving us glycopeptides of asialo-serotransferrin, monoantennary oligosaccharides and SNA, respectively. We are also grateful to Doctor Jean Rommelaere, Doctor Jan Cornelis and the Parvovirus group of U186 for giving us the various FR3T3 cells used in that study, Kay MacLeod and Jean Coll for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the C.N.R.S. (UMR N°111: director : Prof. A. Verbert), the I.N.S.E.R.M., the Pasteur Institute of Lille and the Lille University of Science. V.L. holds a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

- 1- Warren, L., Buck C.A. and Tuszynski, G.P. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* **516**, 96-127
- 2- Yogeswarran, G. and Salk, P. (1981) *Science* **212**, 1514-1516
- 3- Hakomori, S.I. (1985) *Cancer research* **45**, 2405-2414
- 4- Smets, L.A. and Van Beek, W.P. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* **738**, 237-249
- 5- Santer, U.V. and Glick, M.C. (1979) *Biochem.* **18**, 2533-2540
- 6- Dennis, J.W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M.L. and Kerbel, R.S. (1987) *Science* **236**, 582-585
- 7- Warren, L., Fuhrer, J.B. and Buck, C.A. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1838-1842
- 8- Yamashita, K., Okhura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10834-10840
- 9- Pierce, M. and Arango, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10772-10777
- 10- Dennis J.W., Kosh K, Bryce D.M. and Breitman M.L. (1989) *Oncogene* **4**, 853-860
- 11- Dennis J.W. and Laferté S. (1989) *Cancer research* **49**, 945-950
- 12- Dennis, J.W. (1986) *Cancer Res.*, **46**, 5131-5136
- 13- Schimarrcher, V., Altevogt, P., Fogel, M., Dennis, J., Waller, C.A., Barz, D., Schwartz, R., Cheingsong-Popov, R., Springer, G., Robinson, P.J., Nebe, J., Brossmer, W., Vlodavsky, I., Paweletz, N., Zimmermann, H.P. and Uhlenbruck, G. (1982) *Invasion Metastasis* **2**, 313-360
- 14- Nicolson, G.L. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* **695**, 113-176
- 15- Bernacki, R.J. and Kim, V. (1977) *Science* **195**, 577-580
- 16- Grimes, W.J. (1973) *Biochemistry* **12**, 990-996
- 17- Podolsky, D.K. and Weisor, J.J. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3983-3990
- 18- Ip, C. and Dao, T.L. (1977) *Cancer Research* **37**, 3442-3447
- 19- Kessel, D., Sykes, E., and Henderson, M. (1981) *J. Nat. Cancer Inst.* **59**, 29-32
- 20- Bosmann, H.B. and Hill, R. (1974) *FEBS lett.* **44**, 313-316
- 21- Shih, C., Shilo, Z., Goldfarb, M.P., Pannenbuy, A. and Weinberg, R.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5714-5718.

- 22- Santos, E., Tronick, S.R., Aronson, S.A., Puciani, S., and Barbacid, M. (1982) *Nature* **298**, 343-347
- 23- Der, C.J., and Cooper, G.M. (1983) *Cell* **32**, 201-208
- 24- Mc Coy, (1983) *Nature* **302**, 79-81
- 25- Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W.E., and Perucho, M. (1987) *Nature* **327**, 298-303
- 26- Bos, J.L., Toksor, P., Marshall, C.J., Verlaan de Vries, M., Veeneman, G.H., Van der Eb, A.J., Van Boom, J.H., Janssen, J.W.G., and Steenvoorden, A.C.M. (1985) *Nature* **315**, 726-730
- 27- Stanbridge, E.J.(1990) *Science* **247**, 12-13
- 28- Finkel, T., Den, C.J. and Cooper, G.M. (1984)*Cell* **37**, 151-158
- 29- Mc Grath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V., and Levinson, A.D. (1984) *Nature* **310**, 644-649
- 30- Hantey, M.R. and Jackson, T. (1987)*Nature* **328**, 668-669
- 31- Collard, J.G., Van Beek, W.P., Janssen, JW.G., and Schijen J.F (1985) *Int. J. Cancer* **35**, 207
- 32- Bolscher J.G.M., vander Bijl M.M.W., Neefjes J.J., Hall A., Smets L.A., and Ploegh, H.L. (1988) *Embo J.* **7**, 3361-3368
- 33- Schmid K, Mc Naire, M.B., and Burgi, AF. (1958) *J. Biol. Chem.* **230**, 853-864
- 34- Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., and Peumans, W.J.(1984) *Biochem. J.* **221**, 163-169
- 35- Michalski, J.C., Strecker, G., Van Halbeek, H., Dotland, L., and Vliegenthart, J.F.G. (1982)*Carbohydrates* **100**, 351-363
- 36- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S., and Montreuil, J.(1975) *FEBS Lett.* **50**, 296-301
- 37- Seif R. and Cuzin F. (1977) *J. Virol.* **24**, 721-728
- 38- Vennström B., Kahn P., Adkins B., Enrietto P., Hayman H.J., Graf, T., and Luciw, P. (1984) *Embo J.* **2**, 3223-3229
- 39- Salomé N., van Hille B., Duponchel N., Menguizzi G., Cuzin F., Rommelaere, J., and Cornelis, J.J. (1990) *Oncogene* **5**, 123-130
- 40- van Hille B., Duponchel N., Salomé N., Spruyt N., Cotmore S., Tattersall P., Cornelis

- J.J., and Rommelaere, J. (1989) *Virology* **171**, 89-97
- 41- Mousset, S., Cornelis, J., Spruyt, N., and Rommelaere, J. (1986) *Biochimie* **68**, 951-955
- 42- Bradford, M.M.(1978) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 43- Cacan, R., Verbert, A., and Montreuil, J.(1976) *FEBS Lett.* **63**, 102-106
- 44- Lee E.U., Roth J., and Paulson, J.C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13848-13855
- 45- Maniatis T., Fritsh E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning : A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- 46- Shibuya N., Goldstein I.J., Brockaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters B., and Peumans, W.J. (1987)*Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 1-8
- 47- Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618
- 48- Weinstein J., Lee E.U., Mc Entee K., Lai P.H., and Paulson, J.C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17735-17743
- 49- Paulson J.C., Weinstein J., and Schaeur, A. (1989)*J. Biol. Chem.* **264**, 10931-10934
- 50- Colley , K.J., Ujita, L., Beverly, A., Browne, J.K., and Paulson, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17619-17622
- 51- Svensson, E.C., Soreghan, B., and Paulson, J.C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20863-20868
- 52- Wang, X.C., O'Hanlon, T.P., Young, R.F., and Lau, J.T.Y. (1990) *Glycobiology* **1**, 25-31
- 53- Wasylyk, C., Imler J.L., and Wasylyk B. *The Embo J.* **7**, 2475-2483
- 54- Nakoa, K., Lawless, D., Ohe, Y., Miyao, Y., Nakabayashi, H., Kazumobu, M., Ohtsuka, E., and Tamaoki, T. (1990) *Molecular and Cellular Biology* **10**, 1461-1469
- 55- Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp J., Vliegthart, J.F.G., Binette, J.P., and Schmid, K. (1978) *Biochemistry* **17**, 5206-5214
- 56- Nilsson, B., Norden, N.E., and Svensson, S.(1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4545-4553
- 57- Beyer, T.A., Sadler, J.E, Rearick, J. I., Paulson, J.C., and Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* **52** : 23-175.
- 58- Rearick, J.L., Sadler, J.E., Paulson, J.C., and Hill, R.L.(1979) *J.Biol. Chem.* **254** : 4444-4451.
- 59- Joziassse, D.H., Schiphorst W.E.C.M., Van den Eijnden D.H., Van Kuik J.A., Van Halbeek H., and Vliegthart, J.F.G. (1987) *J.Biol. Chem.* **262** : 2025-2033.

CONCLUSIONS

Comme nous l'avons décrit dans ce mémoire, les fibroblastes de Rat FR3T3 transformés par l'oncogène c-Ha-ras révèlent une augmentation importante de l'activité Gal- α -2,6-ST qui, en partie, apparaît être liée à l'augmentation de son expression.

Deux points essentiels ont pu être relevés. Tout d'abord, l'effet observé est induit par l'oncogène c-Ha-ras, mais pas par d'autres oncogènes transformants. Ce phénomène n'est pas corrélé à la transformation cellulaire en terme général. Enfin, l'augmentation de l'activité de la Gal- α -2,6-ST induit une modification de la sialylation de surface cellulaire de manière évidente.

Nous n'avons aucun doute sur l'identité de l'enzyme étudiée. Les résultats de toutes les expérimentations, tant en enzymologie qu'en biologie moléculaire et cellulaire, convergent vers la même observation : il existe une augmentation de l'activité et de l'expression de la Gal- α -2,6-ST dans les cellules transformées par l'oncogène ras (FRras et FRmyc+ras).

La modification des proportions entre les différentes sialyltransférases présentes dans l'appareil de Golgi de ces cellules et, plus particulièrement, de la Gal- α -2,6-ST et de la Gal- α -2,3-ST, induit inévitablement une modification du type de liaison de l'acide sialique sur les structures N-glycanniques des glycoconjugués de surface cellulaire, ceci, en faveur d'une augmentation des liaisons en α -2,6. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents (Paulson *et al.*, 1989a, 1989b, Colley *et al.*, 1989, Lee *et al.*, 1989) montrant que la régulation des sialyltransférases impliquées dans la glycosylation terminale des N-glycanes reposerait essentiellement sur une régulation de l'expression de ces enzymes. En effet, grâce à des études effectuées en fluorescence, nous observons une importante modification de sialylation de la surface cellulaire, entre les cellules normales et transformées par ras.

Cette observation sur la cellule *in vivo* confirme bien les observations faites *in vitro*.

La modification du type de sialylation de surface serait pourtant plus importante que l'augmentation de l'activité et du taux de ARNm de l'enzyme observée *in vitro*. Une quantification précise de ces différences semble assez difficile. Toutefois, ce phénomène apparaît clairement et se justifie par la simple observation faite par l'étude en fluorescence par la SNA-FITC des cellules *in vivo*.

La sialylation de structures N-glycanniques dans des conditions physiologiques dépend de plusieurs facteurs, de la présence des accepteurs, mais aussi de la compétition avec d'autres enzymes présentes dans l'appareil de Golgi (non étudiées dans le cas présent), telles que les fucosyltransférases et les galactosyltransférases ayant pour substrat les mêmes accepteurs que les sialyltransférases. Une diminution du "pool" des autres enzymes compétitrices pourrait éventuellement expliquer l'impact important de l'augmentation de la sialylation en α -2,6 de la surface cellulaire.

L'autre observation intéressante est que ce phénomène est restreint à l'action de l'oncogène ras. De plus des études menées en enzymologie et en fluorescence avec la SNA-FITC avec les autres cellules transformées telles que FRsrc, FRmyc, FRBPV1 et FRmT, ne montre pas d'augmentation de l'activité de l'enzyme, ni de modifications de sialylation de surface cellulaire. Ce phénomène n'est donc pas lié à la transformation.

De nombreux travaux ont montré qu'un oncogène pouvait suffire pour transformer des cellules, et induire des modifications profondes de la glycosylation de surface cellulaire, telle qu'une augmentation de la proportion des glycanes tri- et tétra-antennés (Bolscher *et al.*, 1988; Santer *et al.*, 1989; Dennis *et al.*, 1989). Ainsi Bolsher *et al.*, (1988) ont récemment décrit que, lors de d'expériences de transfection "transcrite" des fibroblastes de Souris NIH3T3 par l'oncogène c-Ha-ras, il apparaissait une modification de la glycosylation de surface cellulaire bien avant l'apparition du phénotype transformé. Cette observation permet de suggérer que les modifications de la glycosylation ne sont pas une conséquence directe de la transformation, mais bien d'un évènement précis apparaissant très tôt et, dans le cas présent, lié à l'action de la protéine p21ras. Cette observation, bien que faite sur un autre modèle cellulaire et dans un autre contexte, est en accord avec nos propres observations.

Comment l'oncogène ras peut-il réguler l'expression de la Gal- α -2,6-ST dans les fibroblastes de Rat ? Le mécanisme d'action de la p21^{ras} est encore peu connu, mais il est clair que cette protéine est impliquée dans les voies gouvernant la prolifération cellulaire. Par ailleurs, nous savons qu'elle est ancrée dans la membrane plasmique, ancrage nécessaire pour maintenir son activité GTPasique intrinsèque. Cette activité est considérablement réduite lors de l'activation de cet oncogène par certaines mutations. Il est probable que ras soit capable d'agir par le biais d'une cascade d'évènements et, dans le cas présent, l'un de ces évènements induirait une augmentation de l'expression de l'enzyme. Quelques travaux ont montré que ras pouvait induire de manière indirecte une régulation transcriptionnelle (positive ou négative) de certains gènes (Wasylyk *et al.*, 1988). Dans notre cas, il est difficile d'affirmer qu'il s'agit bien d'une régulation transcriptionnelle, bien que le taux d'ARNm soit augmenté. Ceci pourrait aussi s'expliquer par la diminution de son "turn-over" du fait d'une meilleure stabilisation. D'autres travaux sont nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux présentés dans ce mémoire nous ont permis d'observer que la transformation de fibroblastes de Rat ou de Hamster par l'oncogène ras, affecte les activités sialyltransférasiques spécifiques des N-glycannes ce qui, d'une façon générale, augmente leur activité. Nous avons plus particulièrement étudié ce phénomène au niveau de fibroblastes de Rat (FR3T3) transformés par l'oncogène ras et par d'autres oncogènes. Il nous est apparu que, pour cette lignée cellulaire, cette augmentation d'activité était due, tout au moins en partie, à une augmentation de l'expression de la Gal- α -2,6-ST, sous l'action spécifique de l'oncogène ras. Cette activation n'a pas été observée dans les cellules transformées par d'autres oncogènes.

D'autres équipes ont montré que l'oncogène ras pouvait, à lui seul, induire des modifications de la glycosylation de la surface cellulaire, se caractérisant par une augmentation de la sialylation (Bolscher *et al*, 1988). Selon ces auteurs, ce phénomène apparaît environ 20 heures après l'expression de ras et avant toute manifestation du phénotype transformé. Ces travaux s'associent à nos résultats pour confirmer que la modification de la glycosylation est liée à un évènement précis, antérieur à la transformation cellulaire.

Les travaux portant sur la conformation, ont permis de montrer que la structure tridimensionnelle des glycannes pouvait être modifiée en fonction de la sialylation. A ce titre, l'étude de la sialylation et des activités sialyltransférasiques des cellules transformées revêt un caractère tout particulier. Les cellules transformées présentent à leur surface des proportions élevées de glycannes tri- et tétra-antennés. A ce niveau, le degré de sialylation est d'autant plus important qu'il contribue au maintien de la conformation étalée du glycanne, conformation dite en "parapluie" qui, de part la surface importante qu'elle occupe, masque des parties importantes de la surface cellulaire. Du fait de cette configuration, les glycannes bi- tri- et tétra-antennés fortement sialylés, contribuent à la diminution de l'immunogénicité des cellules tumorales leur permet tant d'échapper au système immunitaire.

Nos résultats nous ont prouvé qu'il y avait, effectivement, dans tous les cas, une augmentation de la sialylation des N-glycannes de la surface, s'expliquant par une activation des activités N-glycosyl-sialyltransférasiques. D'autre part, nous avons montré que la transformation s'accompagnait d'une multi-antennarisation. Nous n'avons pas effectué de tests de tumorigénicité, mais la capacité de clonage en agar de ces cellules ne laisse aucun doute en ce qui concerne leur tumorigénicité, voire leur pouvoir métastatique. Le masquage des sites antigéniques de la surface cellulaire est favorable à la diffusion métastatique de ces cellules.

Au cours de ce travail, nous avons étudié, exclusivement, les activités sialyltransférasiques; il serait intéressant d'étudier d'autres glycosyltransférases, et notamment, la N-acétylglucosaminyltransférase V responsable de la multi-antennarisation. En effet, des résultats préliminaires obtenus par incubation des glycoprotéines membranaires des cellules transformées par l'oncogène ras (FRras), en présence de la L-PHA (isoforme L de la phytohémagglutinine) marquée à l'iode ^{125}I , nous ont permis de caractériser une augmentation de l'antennarisation des

N-glycannes au niveau de ces cellules. Il reste à comprendre comment l'oncogène ras induit une augmentation de l'expression de cette enzyme et, en particulier, pourquoi ce phénomène est spécifique à ras. Ceci est d'un grand intérêt puisque l'on sait que ras est un oncogène activé dans de nombreux cancers humains (notamment l'oncogène Ki-ras au niveau de tumeurs colorectales)(Santos *et al.*, 1982 ; Parada *et al.*, 1982 ; Hall *et al.*, 1983 Der *et al.*, 1983 ; Mc Coy *et al.*, 1983 ; Forrester *et al.*, 1987 ; Bos *et al.*, 1987). Il serait intéressant de déterminer si ce phénomène peut être observé avec d'autres gènes de la famille ras tels que Ki-ras et N-ras.

Par ailleurs, des travaux ont démontré que l'action de la p21^{ras} activée pouvait être inhibée par micro-injection d'anticorps anti-p21^{ras}. Cette inhibition s'accompagne d'une réversion du phénotype transformé. En utilisant une approche similaire, nous pourrions voir si, avec notre modèle cellulaire (FR3T3), l'activité sialyltransférase Gal- α -2,6-ST est diminuée. Ces résultats nous permettraient de confirmer que le phénomène est bien lié à l'expression de l'oncogène ras. Par ailleurs, la transfection transitoire de cellules par des oncogènes est une technique intéressante, parce qu'elle permet de décrire l'apparition des différents événements affectant la cellule dans le temps (Bolscher *et al.*, 1988). Cette méthode nous permettrait, éventuellement, de déterminer directement le temps nécessaire pour que le produit de l'expression du gène ras induise l'augmentation de l'expression de la Gal- α -2,6-ST.

Comme nous ne pouvons pas actuellement affirmer que ras transactive le gène de la Gal- α -2,6-ST, des études complémentaires seraient nécessaires pour pouvoir le confirmer. La séquence du promoteur de cette enzyme actuellement purifiée et clonée à partir de foie de Rat, a été récemment déterminée par l'équipe de J.C. Paulson (Weinstein *et al.*, 1987). Cette équipe travaille actuellement sur la régulation de cette enzyme et, dans le cadre d'une collaboration, se propose d'étudier notre modèle cellulaire (FR3T3), afin de déterminer si effectivement ras induit une augmentation transcriptionnelle de l'enzyme.

Si c'est effectivement le cas, il faudra démontrer comment la p21^{ras} parvient, en étant dénuée de capacité transactivatrice, à réguler l'activité du promoteur de la Gal- α -2,6-ST. Il semble raisonnable de penser que le produit de ras active, directement ou non, des transactivateurs effecteurs qui vont se fixer de façon spécifique sur des séquences déterminées, au niveau de certains promoteurs comme peut être celui de la Gal- α -2,6-ST. Ces facteurs vont alors activer l'ARN polymérase II et ainsi permettre une augmentation de la transcription du gène correspondant. A ce propos, nous savons que ras peut indirectement activer l'oncogène jun qui est un transactivateur, et qui agit en hétérodimère avec fos, autre activateur génique, pour se fixer sur des sites AP1 présents sur de nombreux promoteurs.

Il est clair que ras ne peut agir que par voie indirecte au niveau transcriptionnel. Les "voies" qui permettent au message délivré par la p21^{ras} de se propager jusqu'au noyau ne sont pas défini et devront faire l'objet d'investigations plus approfondies.

BIBLIOGRAPHIE

- Adari H, DR Lowy, BM Willumsen, CJ Der and F Mc Cormick. 1988
Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain
Science 240 : 518-521.
- Albert B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts and JD Watson. 1983
in "Molecular biology of the cell", Garland, New york.
- Alexander WS, JM Adams and S Cory. 1989a
Oncogene cooperation in lymphocyte transformation : malignant conversion of E μ -myc transgenic Pre-B cells *in vitro* is enhanced by v-H-ras or v-raf but not v-abl
Mol. Cell. Biol. 9 : 67-73.
- Alexander WS, O Bernard, S Cory and JM Adams. 1989b
Lymphomagenesis in E μ -myc transgenic mice can involve ras mutations
Oncogene 4 : 575-581.
- Amouyel P, V Laudet, P Martin, R Li, B Quatannens, D Stéhelin and S Saule. 1989
Two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and p61/63myc, cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells
J. Virol. 63 : 3382-3388.
- Ashwell G and AG Morell. 1974
Enzymology 41 : 99-128.
- Aub JC, C Tielsau and A Lankaster. 1963
Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes I- Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50 : 613-619.
- Aub JC, BH Sanford and MN Cote. 1965
Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 : 396-399.
- Aub JC, BH Sanford and L Wang. 1965a
Relation of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 : 400-402.
- Baker SJ, S Markowitz, ER Fearon, JKV Willson and B Vogelstein. 1990
Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53
Science 249 : 912-914.
- Balmain A and IB Prognell. 1983
Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene
Nature 303 : 72-74.
- Balmain A, M Ramsden, GT Bowden and J Smith. 1984
Activation of the mouse cellular Harvey-ras in chemically induced benign skin papillomas
Nature 307 : 658-660.
- Barbacid M. 1987
ras genes
Annu.Rev.Biochem. 56 : 779-827.

- Bartholomew BA, GW Jourdian and S Roseman. 1973
The sialic acids
J. Biol. Chem. 248 : 5751-5762.
- Bechade C, G Calothy, B Pessac, P Martin, J Coll, F Denhez, S Saule, J Ghysdael and D Stéhelin. 1985
Induction of proliferation or transformation of neuroretina cells by the mil and myc viral oncogenes
Nature 316 : 559-562.
- Beckner SK, S Hattori and TY Shih. 1985
The ras oncogene product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase
Nature 312 : 71-72.
- Bendiak B and GMW Cook. 1982
Kinetic parameters of a β -D-Galactoside α 2-->6 sialyltransferase from embryonic chicken liver
Eur.J.Biochem. 128 : 355-362.
- Bendiak B and GMW Cook. 1983
Comparative rates of transfer of N-acetylneuraminic acid to acceptors bearing one or more Gal (β 1-4)GlcNac(Neu5Ac-Gal)(α 2-6)-sialyltransferase from embryonic chicken liver
Biochem. J. 213 : 253-260.
- Berge PG, A Wilhelm and H Schriewer. 1984
Sialyltransferase activity in tumor tissues
Klin. Wochenschr. 62 : 331-336.
- Berger EG and FJ Hesford. 1985
Localization of galactosyl- and sialyltransferase by immunofluorescence : evidence for different sites
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 4736-4739.
- Bernacki RJ and K Untae. 1977
Concomitant elevations in serum sialyltransferase activity and sialic acids content in Rats with metastasizing mammary tumors
Science 195 : 577-580.
- Berridge MJ and RF Irvine. 1984
Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction
Nature 312 : 315-319.
- Bertolotti R, Rutishauser V and Edelman GM. 1980
A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cell.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4831-4835.
- Beyer TA, JE Sadler, JI Rearick, JC Paulson and RL Hill. 1981
Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships.
Adv. Enzymol. 52 : 23-175.
- Bignami M, S Rosa, SA La Rocca, G Falcone and F Tato. 1988
Differential influence of adjacent normal cells on the proliferation of mammalian cells transformed by the viral oncogenes myc, ras and src
Oncogene 2 : 509-514.
- Birchmeier C, D Broek and M Wigler. 1985
Ras proteins can induce meiosis in xenopus oocytes
Cell 43 : 615-621.

- Bishop JM. 1985
Viral oncogenes
Cell 42 : 23-38.
- Bishop JM. 1987
The molecular genetics of cancer
Science 235 : 305-331.
- Bolscher JGM, MMW van der Bijl, JJ Neefjes, A Hall, LA Smets and HL Ploegh. 1988
Ras (proto)oncogene induces N-linked carbohydrate modification : temporal relationship with induction of invasive potential.
Embo J. 7 : 3361-3369.
- Bos JL, D Toksoz, CJ Marshall, M Verlaan de Vries, GH Veeneman, AJ Van Der Eb, JH Van Boom, JWG Janssen and ACM Steenvoorden. 1985
Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia
Nature 315 : 726-730.
- Bos JL, ER Fearon, SR Hamilton, M Verlaan-de Vries, J H van Boom, AJ van der Eb and B Vogelstein. 1987
Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers
Nature 327 : 293-297.
- Bosman HB. 1972
Sialyltransferase activity in normal and RNA- and DNA-virus transformed cells utilizing desialyzed, trypsinized cell plasma membrane external surface glycoproteins as exogenous acceptors.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49 : 1256-1262.
- Bosman HB and TC Hall. 1974
Enzyme activity in invasive tumors of human breast and colon
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 1833-1837.
- Bouhours D and JF Bouhours. 1983
Developmental changes of hematoside of Rat small intestine
J. Biol. Chem. 258 : 299-304.
- Bouhours D and JF Bouhours. 1988
Tissues-specific expression of GM3(NeuGc) and GD3(NeuGc) in epithelial cells of the small intestine of strains in inbred Rats
J. Biol. Chem. 263 : 15540-15545.
- Buck CA and AF Horwitz. 1987
Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion
J. Cell. Sci. Suppl. 8 : 231-250.
- Cales C, JF Hancock, CJ Marshall and A Hall. 1988
The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product
Nature 332 : 548-551.
- Carlson DM, EJ McGuire, GW Jourdian and S Roseman. 1973a
The sialic acids
J. Biol. Chem. 248 : 5763-5773.
- Carlson DM, GW Jourdian and S Roseman. 1973b
The sialic acids
J. Biol. Chem. 248 : 5742-5750.
- Casalbore P, E Agostini, S Alema, G Falcone and F Tato. 1987
The v-myc oncogene is sufficient to induce growth transformation of chick neuroretina cells
Nature 326 : 188-190.

- Chang EH, ME Furth, EM Scolnick and DR Lowy. 1982
 Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogenes of Harvey Murine Sarcoma virus
 Nature 297 : 479-483.
- Chardin P and A Tavitian. 1986
 The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe
 EMBO J. 5 : 2203-2208.
- Chatterjee SK. 1979a
 Glycosyltransferases in metastasizing and non-metastasizing rat mammary tumors and the release of these enzymes in the host sera.
 Eur. J. Cancer 15 : 1351-1356.
- Chatterjee SK, M Bhattacharya and JJ Barlow. 1979b
 Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients
 Cancer Res. 39 : 1943-1951.
- Chiu R, WJ Boyle, J Meek, T Smeal, T Hunter and M Karin. 1988
 The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes
 Cell 54 : 541-552.
- Cichutek K and PH Duesberg. 1986
 Harvey ras genes transform without mutant codons, apparently activated by truncation of a 5' exon (exon-1)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 2340-2344.
- Cohen JB and AD Levinson. 1988
 A point in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras
 Nature 334 : 119-124.
- Collard JG, WP van Beek, JWJ Janseen and JF Schijven. 1985
 Transfection by human oncogenes : concomitant induction of tumorigenicity and tumor-associated membran alterations
 Intern. J. Cancer 35 : 207-214.
- Collard JG, JF Schijven, A Bikker, G La Riviere, JGM Bolscher and E Roos. 1986
 Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas
 Cancer Res. 46 : 3521-3527.
- Colley KJ, EU Lee, B Adler, JK Browne and JC Paulson. 1989
 Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of NH2-terminal signal anchor with a signal peptide
 J. Biol. Chem. 264 : 17619-17622.
- Cooper GM. 1985
 Molecular and functional analysis of ras and Blym transforming genes
 Prog. Ca. Res. Therapy 32 : 1-9.
- Coperland NG, AD Zelenetz and GM Cooper, 1979
 Transformation of NIH3T3 mouse cells by DNA of Rous Sarcoma Virus
 Cell 17 : 993-1002.
- Croce CM. 1987
 Role of human translocations in human neoplasia
 Cell 49 : 155-156.

- Cuzin F, M Rassoulzadegan and L Lemieux. 1982
Multigenic control of tumorigenesis : three distinct oncogenes are required for transformation of Rat embryo fibroblasts by polyoma virus
Cancer Cells 2 : 109-116.
- Dairaku K, T Miyagi, A Wakui and S Tsuiki. 1983
Increase in serum sialyltransferase in tumor-bearing Rats : the origin and nature of the increased enzyme
Gann 74 : 656-662.
- Davenport EA, BL Drobos, SL Menke, TB Vaidya and EJ Taparowsky. 1988
Cooperation of oncogenes in the multistep transformation of established fibroblasts in culture
AntiCancer Res. 8 : 959-970.
- Debray H, P Delannoy, P Debeire and J Montreuil. 1983
Isolation and characterisation of glycopeptides from virus-transformed Baby Hamster Kidney cells
Proc. 7th Int. Symp. Glycoconj., Lund-Ronneby, Sweden, pp172-173.
- Debray H, Z Qin, P Delannoy, J Montreuil, D Dus, C Radzikowski, B Christensen and Kieler J. 1986
Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines
Int. J. Cancer 37 : 607-611.
- Delannoy P, H Debray and J Montreuil. 1985
Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation des cellules BHK 21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster
C. R. Acad. Sci. (Paris) 301 : 767-771.
- Dennis JW, JP Carver and H Schachter. 1984
Asparagine-linked oligosaccharides in murine tumor cells : comparison of a WGA-resistant (WGA^r) nonmetastatic mutant and a related WGA-sensitive (WGA^s) metastatic line
Journal of Cell Biology 99 : 1034-1044.
- Dennis JW. 1986
Different metastatic phenotypes in two genetic classes of wheat germ agglutinin-resistant tumor cell mutants
Cancer Res. 46 : 4594-4600.
- Dennis JW, S Laferté, C Waghorne, ML Breitman and RS Kerbel. 1987
 β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis
Science 236 : 582-585.
- Dennis JW, K Kosh, DM Bryce and ML Breitman. 1989a
Oncogenes conferring metastatic potential induce increased branching of Asn-linked oligosaccharides in Rat2 fibroblasts
Oncogene 4 : 853-860.
- Dennis JW and S.Laferté. 1989b
Oncodevelopmental expression of -GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man β 1- branched asparagine-linked oligosaccharides in Murine tissues and Human breast carcinomas.
Cancer Res. 49 : 945-950.
- Der CJ and GM Cooper. 1983
Altered gene products are associated with activation of cellular ras-k genes in human lung and colon carcinomas
Cell 32 : 201-208.
- De Vos AM, L Tong, MV Milburn, PM Matias, J Jancarik, S Noguchi, S Nishimura, K Miura, E Ohtsuka and SH Kim. 1988
Three-dimensional structure of an oncogene protein : catalytic domain of human c-H-ras p21
Science 239 : 888-893.

- Doherty P, J Cohen and FS Walsh. **1990**
Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid
Neuron **5** : 209-219.
- Dozier C, J Coll, S Ravit, D Stéhelin and S Saule. **1988**
Prolifération cellulaire et coopération des oncogènes v-mil et v-myc
Biochimie **70** : 885-894.
- Downward J, Y Yarden, E Mayes, G Scrace, N Totty, P Stockwell, A Ullrich, J Schlessinger and MD Waterfield. **1984**
Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences
Nature **307** : 521-527.
- Fasano O, D Birnbaum, L Edlund, J Fogh and M Wigler. **1984**
New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay.
Mol. Cell. Biol. **4** : 1695-1705
- Fleischman LF, SB Chahivala, L Cantley. **1986**
Ras-transformed cells : altered levels of phosphatidylinositol-4,5-biphosphate and catabolites
Science **231**: 407-410.
- Finlay CA, PW Hinds and H Levine. **1989**
The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation
Cell **57** : 1083-1093.
- Finne J and PH Makela. **1985**
Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase
J. Biol. Chem. **260** : 1265-1270.
- Foidart IM, JJ Bere, L Paglia, SI Rennard, M Gullino, GR Martin and SI Katz. **1980**
Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a non collagenous basement membrane glycoprotein
Lab. Invest. **42** : 336-342
- Forrester K, C Almoguera, K Han, WE Grizzle and M Perucho. **1987**
Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis
Nature **327** : 298-303.
- Frech M, J John, V Pizon, P Chardin, A Tavitian, R Clark, F McCormick and A Wittinghofer. **1990**
Inhibition of GTPase activating protein stimulation of ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product
Science **249** : 169-171.
- Fried M. **1965**
Cell transformation ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **53** : 486-491.
- Friend SH, R Bernards, S Rogelj, RA Weinberg, JM Rapaport, DM Albert and TP Dryja. **1986**
A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma
Nature **323** : 643-646.
- Friend SH, JM Horowitz, MR Gerber, XF Wang, E Bogenmann, FP Li and RA Weinberg. **1987**
Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors : organization of the sequence and its encoded protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 9059-9063.

- Frithz G, G Ronquist and P Ericsson. **1985**
Serum sialyltransferase and fucosyltransferase activities in patients with multiple myeloma
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **21** : 913-917.
- Furukawa K, H Yamagushi, HF Oettgen, LJ Old and KO Lloyd. **1988**
Analysis of the expression of N-Glycolylneuraminic acid-containing gangliosides in cells and tissues using two human monoclonal antibodies
J. Biol. Chem. **263** : 18507-18512.
- Gabius HJ. **1987a**
Vertebrate lectins and their possible role in fertilization, development and tumor biology
In vivo **1** : 75-84.
- Gabius HJ, R Engelhardt and F Cramer. **1987b**
Expression of endogenous lectins in human small-cell carcinoma and undifferentiated carcinoma of the lung
Carbohydrate Res. **164** : 33-41.
- Gabius HJ, G Bandlow, V Schirmacher, GA Nagel and K Vehmeyer. **1987c**
Differential expression of endogenous sugar-binding proteins (lectins) in murine tumor model systems with metastatic capacity
Int. J. Cancer **39** : 643-648.
- Gottschalk A. **1981**
Correlation between composition, structure, and function of a salivary mucoprotein.
Nature **186** : 949-951.
- Graf T, FV Weizsaecker, S. Grieser, J Coll, D Stéhelin, T Patschinsky, K Bister, C Bechade, G Calothy and A Leutz. **1986**
v-mil induces autocrine growth and enhanced tumorigenicity in *v-myc*-transformed avian macrophages.
Cell **45** : 357-364.
- Graham FL and AJ Van Der Eb. **1973**
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
Virology **52** : 456-467.
- Grant CWM and MW Peters. **1984**
Lectin-membrane interactions information from model systems
Biochim. Biophys. Acta **779** : 403-422.
- Griffiths J and S Reynolds. **1982**
Plasma sialyltransferase total and isoenzyme activity in the diagnosis of cancer of the colon
Clin. Biochem. **15** : 46-48.
- Grimes WJ. **1970**
Sialic acid transferases and sialic acid levels in normal and transformed cells
Biochemistry **9** : 5083-5092.
- Grimstad IA. **1987**
Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion
Exp. Cell. Res. **173** : 515-523.
- Hagag N, JC Lacal, M Graber, S Aaronson and MV Viola. **1987**
Microinjection of *ras* p21 induces a rapid rise in intracellular pH
Mol. Cell. Biol. **7** : 1984-1988.
- Hakomori S. **1983**
Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis
Annu. Rev. Biochem. **50** : 733-764.

- Hall A, CJ Marshall, NK Spurr and RA Weiss. **1983**
Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1
Nature **303** : 396-303.
- Hall A. **1990a**
Ras and GAP- who's controlling whom ?
Cell **61** : 921-923.
- Hall A. **1990b**
The cellular function of small GTP-binding proteins
Science **249**, 635-640.
- Hancock JF, AI Magee, JE Childs and CJ Marshall. **1989**
All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated
Cell **57**, 1167-1177.
- Hanley MR and T Jackson. **1987**
Transformer and transducer
Nature **328** : 668-669.
- Harel J. **1989**
De l'oncogène à l'anti-oncogènes. Aperçus récents a propos du gène de susceptibilité au rétinoblastome
Bull. Cancer. **76** : 339-346.
- Harris H. **1986**
Malignant tumors generated by recessive mutations
Nature **323** : 582-583.
- Havenport. **1982**
Eur. J. Biochem. **122**, 305-311.
- Herrmann WP and W Gielen. **1979**
Sialyltransferase levels and sialic acid concentrations in sera of patients with malignant melanomas
Arch. Dermatol. Res. **265** : 321-329.
- Higashi H, Y Hirabayashi, Y Fukui, M Naiki, M Matsumoto, S Ueda and S Kato. **1985**
Characterisation of N-glycolylneuraminic acid -containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer
Cancer Res. **45** : 3796-3802.
- Hischberg CB and M Yeh. **1977**
Sialic acid uptake by BHK Cells and subsequent incorporation into glycoproteins and glycolipids
J. Supramol. Structure **6** : 571-577.
- Hoshino M, M Kawakita and S Hattori. **1988**
Characterization of a factor that stimulates hydrolysis of GTP bound to ras gene product p21 (GTPase-activating protein) and correlation of its activity to cell density
Mol. Cell. Biol. **8** : 4169-4173.
- Hunter T. **1987**
Oncogenes and growth control. Bradshaw RA, Prentis S, eds, Oncogenes growth factors, New York : Elsevier Fishers, pp 135-142.
- Hynes R. **1985**
Molecular biology of fibronectin
Annu. Rev. Cell. Biol. **1** : 67-90.

- Imler JL, C Schatz, C Wasylyk, B Chatton and B Wasylyk. 1988
A Harvey-ras responsive transcription element is also responsive to a tumour promoter and to serum
Nature 332 : 275-278.
- Jelinek WR, TP Toomey, L Leinwand, CH Duncan, PA Biro, PV Choudary, SM Weissman, CM Rubin, CM Houck, PL Deininger and CW Schmid. 1980
Ubiquitous interspersed repeated sequences in mammalian genomes.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 77 : 1398-1402
- Joziase DH, MLE Bergh, HGJ Terhart, PL Koppen, GJM Hooghwinkel and DH van den Eijnden. 1985
Purification and enzymatic characterization of CMP-sialic acid : β -galactosyl1-->3-N-acetylgalactosaminide α 2-->3-sialyltransferase from human placenta
J. Biol. Chem. 260 : 4941-4951.
- Joziase DH, WECM Schiphort, DH van den Eijnden, JA van Kuik, H van Halbeek and JFG Vliegthart. 1987
Branch specificity of bovine colostrum CMP-sialic acid : Gal β 1-->4GlcNAC-R α 2-->6-sialyltransferase
J. Biol. Chem. 262 : 2025-2033.
- Jurnac F, S Heffron and E Bergmann. 1990
Conformational changes involved in the activation of ras p21 : implications for related proteins
Cell 60 : 525-528.
- Kamata T and JR Feramisco. 1984
Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins
Nature 310 : 147-150.
- Kessel DH, TH Chou and RC Coombes. 1981
Studies on sialyltransferase isoenzymes in plasma of patients with breast cancer
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 17 : 1035-1040.
- Kitayama H, Y Sugimoto, T Matsuzaki, Y Ikawa and M Noda. 1989
A ras-related gene with transforming suppressor activity
Cell 56 : 77-84.
- Klein G. 1987
The approaching era of tumor suppressor genes
Science 238 : 1539-1545.
- Kobata A. 1984
The carbohydrate of glycoproteins
In "Biology of carbohydrates" 2, V. Ginsburg and P.W. Robins.
- Kobata A. 1987
Malignant transformational changes of the sugar chains of glycoproteins and their clinical value in "Development and recognition of the transformed cell" M.I. Greene and T. Hamaoka Eds., Plenum, New York, pp 385-405.
- Kornfeld R and S Kornfeld. 1985
Assembly of asparagine linked oligosaccharides
Annu. Rev. Biochem 54 : 631-664.

- Lacal JC, E Santos, V Notario, M Barbacid, S Yamazaki, HF Kung, C Seamans, S Mc Andrew and R Crowl. **1984**
Expression of normal and transforming H-ras genes in *Escherichia coli* and purification of their encoded p21 proteins
Proc Natl. Acad. Sci. USA **81** : 5305-5309.
- Lacal JC, P de la Pena, J Moscat, P Garcia-Barreno, PS Anderson and SA Aaronson. **1987**
Rapid stimulation of diacylglycerol production in xenopus oocytes by microinjection of H-ras p21
Science **238** : 533-536.
- Land H, LF Parada and RA Weinberg. **1983**
Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes
Nature **304** : 596-602.
- Land H, AC Chen, JP Morgenstern, LF Parada and RA Weinberg. **1986**
Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts
Mol. Cell. Biol. **6** : 1917-1925.
- Langdon WY, AW Harris and S Cory. **1988**
Growth of E μ -myc transgenic B-lymphoid cells *in vitro* and their evolution towards autonomy
Oncogene Res. **3** : 271-279.
- La Rocca SA, M Grossi, G Falcone, S Alema and F Tato. **1989**
Interaction with normal cells suppresses the transformed phenotype of v-myc-transformed quail muscle cells
Cell **58** : 123-131.
- Larsen E, T Palabrica, S Sajer, GE Gilbert, DD Wagner, BC Furie and B Furie. **1990**
PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15)
Cell **63** : 467-474.
- Lee EU, J Roth and JC Paulson. **1989**
Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of chinese hamster ovary cells by expression of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase
J. Biol. Chem. **264** : 13848-13855.
- Lee WH, R Bookstein, F Hong, LJ Young, JY Shew and EYHP Lee. **1987**
Human retinoblastoma susceptibility gene : cloning, identification, and sequence
Science **235** : 1394-1399.
- Lee WH, JY Shew, FD Hong, TW Sery, LA Donoso, LJ Young, R Bookstein and EYHP Lee. **1987**
The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity
Nature **329** : 642-645.
- Licata AA, J Woll and L Cave. **1982**
Measurement of sialyltransferase activity and serum glycoproteins in malignant and benign (hyperparathyroid) hypercalcemia
Cancer **50** : 2126-2130.
- Liepkans V, A Jolif and G Larson. **1988**
Purification and characterization of a CMP-sialic : LcOse₄ Cer sialyltransferase from human colorectal carcinoma cell membranes
Biochem. **27** : 8683-8688.

- Lowe DG, DJ Capon, E Delwart, AY Sakaguchi, SL Naylor and DV Goeddel. 1987
Structure of the human and murin R-ras genes, novel genes closely related to ras proto-oncogene
Cell 48 : 137-146.
- Lowe JB, LM Stoolman, RP Nair, RD Larsen, TL Berhend and RM Marks. 1990
ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by transfected human fucosyltransferase cDNA
Cell 63 : 475-484.
- Macara IG. 1989
Elevated phospho-choline concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown
Mol. Cell. Biol. 9 : 325-328.
- Madaule P and R Axel. 1985
A novel ras-related gene family
Cell 41 : 31-40.
- Marshall C. 1982
A transforming gene present in human sarcoma cell lines.
Nature 299 : 171-173.
- Marshall RD and A Neuberger. 1968
The metabolism of glycoproteins and blood-group substances. In "Carbohydrate metabolism and its disorders" Dickens F., Randle P.J. and Weelan W.J., eds. Academic Press, New York, pp 213-258.
- Martin P, Henry C, Ferre F, M Duterque-Coquillaud, C Lagrou, J Ghysdael, B Debuire, D Stéhelin and S Saule. 1986
Transforming of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human c-myc gene.
Embo J 5 : 1529-1533.
- Martin GS. 1970
Rous Sarcoma Virus : a function required for the maintenance of the transformed state
Nature 227 : 1021-1023.
- Mc Cormick F. 1989a
Gasp : not just another oncogene
Nature 340 : 678-679.
- Mc Cormick F. 1989b
ras GTPase activating protein : signal transmitter and signal terminator
Cell 56 : 5-8.
- Mc Coy MS, JJ Toole, JM Cunningham, EH Chang, DR Lowy and RA Weinberg. 1983
Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene
Nature 302 : 79-81.
- Mc Grath JP, DJ Capon, DV Goeddel and AD Levinson. 1984
Comparative Biochem. properties of normal and activated human ras p21 protein
Nature 310 : 644-649.
- Meneguzzi G, B Binétruy, M Grisoni and F Cuzin. 1984
Plasmidial maintenance in rodent fibroblasts of BPV1-pBR322 shuttle vector without immediately apparent oncogenic transformation of the recipient cells.
Embo J. 3 : 365-371.

- Meromsky L,R Lotan and A Raz. 1987
Implications of endogenous tumor cell surface lectins as mediators of cellular interactions and lung colonization
Cancer Res. 46 : 5270-5275.
- Metcalf D. 1989
The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells
Nature 339 : 27-30.
- Montreuil J. 1975
Pure and Appl. Chem. 42 : 413-477.
- Montreuil J. 1980
Primary structure of glycoprotein glycans - Basis for the molecular biology of glycoproteins
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37 : 157-223.
- Montreuil J. 1982
in "Comprehensive Biochemistry" A Neuberger and LLM Van Deenen Eds, Elsevier, Amsterdam, 19B, part II, p.1.
- Montreuil J, H Debray, P Debeire and P Delannoy. 1983
in "Structural carbohydrates in the liver", Edt H Popper, Falk Symposium 34, New York p.239-258.
- Montreuil J. 1984a
Spatial conformation of glycans and glycoprotein
Bio. Cell. 51 : 115-132.
- Montreuil J. 1984b
Spatial structures of glycans chains of glycoproteins in relation to the metabolism and function
Survey of a decade of Res.
Pure Appl. Chem. 56 : 859-877.
- Montreuil J, 1987
Structure and conformation of glycoproteins glycans in "Vertebrate lectins", K Olden and JB Perents Eds, Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp 1-29.
- Morell AG, G Gregoriades, IH Scheinberg, J Hickman and G Ashwell, 1971
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation
J. Biol. Chem. 246 : 1461-1467.
- Morello D and C Babinet. 1989
Oncogènes et développement
M&S 5 : 16-23.
- Mountford CE and LC Wright. 1988
Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells : a new model
Trends Biochem. Sci. 13 : 172-177.
- Mousset S, J Cornelis, N Spruyt and J Rommelaere. 1986
Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey-*ras* or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute-virus-of-mice
Biochimie 68 : 951-955.
- Müller R, DJ Slamon, JM Tremblay, MJ Cline and IM Verma. 1982
Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse
Nature 299 : 640-644.

- Munro JH, S Narasimhan, S Wetmore, JR Riordan and H Schachter. 1975
Intracellular localization of GDP-L-Fucose glycoprotein and CMP-Sialic acid: apolipoprotein glycosyltransferase in Rat and Pork livers
Arch. Biochem. Biophys **169** : 269-277.
- Nakao K, D Lawless, Y Ohe, Y Miyao, H Nakabayashi, H Kamiya, K Miura, E Ohtsuka and T Tamaoki. 1989
C-Ha-ras down regulates the α -fetoprotein gene but not the albumin gene in human hepatoma cells
Mol. Cell. Biol. **10** : 1461-1469.
- Neville AM. 1986
Tumor markers and their clinical value
Tumor Biol. **7** : 83-90.
- Newbold R. 1983
Mutant ras proteins and cell transformation
Nature **310** : 628-629.
- Nicolson. 1982
Cancer metastasis-Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells
Biochim. Biophys. Acta. **738** : 237-249.
- Nishi Y and H Higashi. 1983
Hanganuzzi-Deicher heterophile antigen in human retinoblastoma cells
American Journal of Ophthalmology **96** : 321-325.
- Noda M, M Ko, A Ogura, DG Liu, T Amano, T Takano and Y Ikawa. 1985
Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line
Nature **318** : 73-75.
- Nowell PC. 1960
Phytohemagglutinin : an inhibitor of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. **20** : 462-466.
- Nowell PC. 1986
Mechanisms of tumors progression
Cancer Res. **46** : 2203-2207.
- Olofsson B, P Chardin, N Touchot, A Zahraoui and A Tavitian. 1988
Expression of the ras-related ralA, rho12 and rab genes in adult mouse tissues
Oncogene **3** : 231-234.
- Owen RD and MC Ostrowski. 1987
Rapid and selective alterations in the expression of cellular genes accompany conditional transcription of Ha-v-ras in NIH 3T3 cells
Mol. Cell. Biol. **7** : 2512-2520.
- Pai EF, W Kabsch, U Krengel, KC Holmes, J John and A Wittinghofer. 1989
Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation
Nature **341** : 209-214.
- Palcic MM, J Ripka, KJ Kaur, M Shoreibah, O Hindsgaul and M Pierce. 1990
Regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V activity
J. Biol. Chem. **265** : 6759-6769.
- Pâquet MR and MA Moscarello. 1985
The modulation of glycosyltransferase activity in golgi membranes
in "Membrane Fluidity in Biology" vol. 4 pp 209-245 in academic press. Inc. New York.

- Parada LF, CJ Tubin, C Shih and RA Weinberg. 1982
Human EJ bladder carcinoma oncogenes homologous of Harvey sarcoma virus ras gene
Nature 297 : 474-478.
- Parish RW, C Shmidhauser, T Schmidt and T Dudler. 1987
Mechanism of tumor cell metastasis
J. Cell. Sci. Suppl. 8 : 181-197.
- Passaniti A and GW Hart. 1988
Cell surface sialylation and tumor metastasis
J. Biol. Chem. 263 : 7591-7603.
- Paulson JC, WE Beranek and RL Hill. 1977a
Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose
J. Biol. Chem. 252 : 2356-2362.
- Paulson JC, JI Rearick and RL Hill. 1977b
Enzymatic properties of β -D-galactoside α 2---->6 sialyltransferase from bovine colostrum
J. Biol. Chem. 252 : 2363-2371.
- Paulson JC, JP Prieels, LR Glasgow and RL Hill. 1978
Sialyl- and fucosyltransferases in the biosynthesis of asparaginyllinked oligosaccharides in glycoproteins
J. Biol. Chem. 253 : 5617-5624.
- Paulson JC, J Weinstein and A Schauer. 1989a
Tissue-specific expression of sialyltransferases
J. Biol. Chem. 264 : 10931-10934.
- Paulson JC and KJ Colley. 1989b
Glycosyltransferases: Structure, localisation and control of cell type-specific glycosylation
J. Biol. Chem. 264 : 17615-17618.
- Pawson T. 1988
Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases : regulatory elements in signal transduction
Oncogene 3 : 491-495.
- Pierce M and J Arongo. 1986
Rous sarcoma virus-transformed Baby Hamster Kidney Cells express higher levels of Asn-linked tri- and tétra-antennary glycopeptides containing [GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man] and poly-Nacétyllactosamine sequences that Baby Hamster Kidney Cells.
J. Biol. Chem. 261 : 10772-10777.
- Pizon V, P Chardin, I Lerosey, B Olofsson and A Tavitian. 1988
Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the "effector" region
Oncogene 3 : 201-204.
- Podolsky DK and MM Weiser. 1975
Galactosyl transferase activities in human sera : detection of a cancer-associated isoenzyme
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 65 : 545-551.
- Podolsky DK and MM Weiser. 1979
Purification of galactosyltransferase "isoenzymes" I and II
J. Biol. Chem. 254 : 3983-3990.
- Quaife CJ, CA Pinkert, DM Ornitz, RD Palmiter and RL Brinster. 1987
Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice
Cell 48 : 1023-1034.

- Rassoulzadegan M, A Cowie, A Carr, N Glaichenhaus, R Kamen and F Cuzin. 1982
The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation
Nature **300** : 713-718.
- Raz A. 1988
Adhesive properties of metastasizing tumour cells
Metastasis. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 141) p 109-122.
- Rearick JI, JE Sadler, JC Paulson and RL Hill. 1979
Enzymatic characterization of β -D-galactoside $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase from porcine submaxillary gland
J. Biol. Chem. **254** : 4444-4451.
- Reddy EP, RK Reynolds, E Santos and M Barbacid. 1982
A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties of the T24 bladder carcinoma oncogene
Nature **300** : 149-152.
- Ronquist G, A Rimsten, M Westman and E Cerven. 1980
Serum sialyltransferase activity in benign and malignant diseases
Acta Chir. Scand. **146** : 247-252.
- Ronquist G, A Rimsten, C Blanche, E Cerven, C Hiesche and M Westman. 1982
Serum glycosyl transferases and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal carcinoma in different stages
Acta Chir. Scand. **148** : 373-377.
- Ronquist G and E Nou. 1983
Serum sialyltransferase and fucosyltransferase activities in patients with bronchial carcinoma
Cancer **52** : 1679-1683.
- Roth J, J Lucocq and PM Charest. 1984
Light and electron microscopic demonstration of sialic acid residues with the lectin from *Limax flavus*: a cytochemical affinity technique with the use of fetuin-gold complexes
J. Histochem. Cytochem. **32** : 1167-1176.
- Roth J, DJ Taajest, J Weinstein, JC Paulson, P Greenwell and WM Watkins. 1986
Differential subcompartmentation of terminal glycosylation in the Golgi apparatus of intestinal absorptive and goblet cells
J. Biol. Chem. **261** : 14307-14312.
- Rozenberg A and CL Schengrund. 1976
in "Biological roles of sialic acid" Plenum press. New York and London
- Rozengurt E. 1986
Early signals in the mitogenic response
Science **234** : 161-166.
- Ruley HE. 1983
Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture
Nature **304** : 602-606.
- Rutishauser V, A Acheson, AK Hall, DM Mann and J Sunshine. 1988
The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions
Science **240** : 53-57.

- Sadler JE, JI Rearick, JC Paulson and RL Hill. 1979
Purification to homogeneity of a β -galactoside $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase and partial purification of an α -N-acetylgalactosaminide $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialyltransferase from porcine submaxillary glands
J. Biol. Chem. 254 : 4434-4443.
- Sadler JE. 1984
Biosynthesis of glycoproteins : formation of O-linked oligosaccharides, in " Biology of Carbohydrate" V. Ginsburg and PW Robbins Eds, Wiley, New York, pp 199-288.
- Santer UV and MC Glick. 1979
Partial structure of a membrane glycopeptide from virus-transformed hamster cells
Biochemistry 18 : 2533-2540.
- Santer UV, R DeSantis, KJ Hard, JA van Kuik, JFG Vliegenthart, B Won and MC Glick. 1989
N-linked oligosaccharide changes with oncogenic transformation require sialylation of multiantennae
Eur.J.Biochem. 181 : 249-260.
- Santos E, SR Tronick, SA Aronson, S Puciani and M Barbacid. 1982
T24 humanbladder carcinoma oncogene is an activated form for the human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes
Nature 298 : 343-347.
- Sasaki M, S Barber and RL Ceriani. 1985
Breast cancer markers : comparison between sialyltransferase and human mammary epithelial antigens (HME-Ags) for the detection of human breast tumors grafted in nude mice
Breast Cancer Res. and Treatment 5 : 51-56.
- Schauer R. 1985
Sialic acids and their role as biological masks
TIBS 357-360.
- Schauer R. 1982
in "Sialic acid. Chemistry, metabolism and fonction" edited by R. Schauer. Cell Biology Monograph. Springer-Verlag Wien New York.
- Schirmmacher V, P Altevogt, M Fogel, J Dennis, CA Waller, D Barz, R Schwartz, R Cheingsong-Popov, G Springer, PJ Robinson, T Nebe, W Brossmer, I Vlodyavsky, N Paweletz, HP Zimmermann and G Uhlenbruck. 1982
Importance of cell surface carbohydrates in cancer cell adhesion, invasion and metastasis
Invasion Metastasis 2 : 313-360.
- Shaper NL., JH Shaper, JL Meuth, JL Fox, H Chang, IR Kirsch and GF Hollis. 1986
Bovine galactosyltransferase : identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 1573-1577.
- Sharon N and H Lis. 1987
A century of lectin Res. (1888-1988)
TIBS 12 : 488-491.
- Shaw L and Schauer R. 1988
The biosynthesis of N-Glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-Glycoside of N-Acetylneuraminic acid
Biol. Chem. 369 : 477-486
- Sherblom AP and CE Dahlin. 1985
N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid in the O-linked oligosaccharides of a tumor cell glycoprotein
J. Biol. Chem. 260 : 1484-1492.

- Sherblom AP, RM Smagula, CE Moody and GW Anderson. **1986**
Sialyltransferase of bovine serum : age- and hormone-related changes
Comp. Biochem. Physiol. **84B** : 309-313.
- Shibuya N, IJ Goldstein, WF Broekaert, M Nsimba-Lubaki, B Peeters and WJ Penmans. **1987**
The elderberry (sambucus nigra L) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence
J. Biol. Chem. **262** : 1596-1601.
- Sigal IS, JB Gibbs, JS D'Alonzo and EM Scolnick. **1986**
Identification of effector residues and a neutralizing epitope of Ha-ras-encoded p21
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 4725-4729.
- Sigal IS. **1988**
A structure and some function
Nature **332** : 485-486.
- Silver HKB, KA Karim, EL Archibald and FA Salinas. **1979**
Serum sialic acid and sialyltransferase as monitors of tumor burden in malignant melanoma patients
Cancer Res. **39** : 5036-5043.
- Singer ST and GL Nicolson. **1972**
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science **175** : 720-731.
- Smets LA. and WP Van Beek. **1984**
Carbohydrates of the tumor cell surface
Biochim. Biophys. Acta **738** : 237-249.
- Soubigou IRP, L Debussche, C David, A Morgat, PE Bost, JF Mayaux and B Tocque. **1989**
Antibodies to synthetic peptide from the residue 33 to 42 domain of c-Has-ras p21 block reconstitution of the protein with different effectors
Mol. Cell. Biol. **9** : 3904-3910.
- Spandidos DA and NM Wilkie. **1984**
Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene
Nature **310** : 469-475.
- Stéhelin D., Varmus and JM Bishop. **1976**
DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA.
Nature **260** : 170-174.
- Stéhelin D. **1988**
Dissection moléculaire des cancers
Bull. Inst. Pasteur **86** : 225-242.
- Stern DF, MP Kamps and H Cao. **1988**
Oncogenic activation of p185^{neu} stimulates tyrosine phosphorylation in vivo
Mol. Cel. Biol. **8** : 3969-3973.
- Steward JF, RD Rubens, S Hoare, RD Bulbrook and D Kessel. **1982**
Serum sialyl transferase levels in patients with metastatic breast cancer treated by chemotherapy
Br. J. Cancer **46** : 208-212.
- Steward J, R Rubens, R Millis, J Hayward, S Hoare, R Bulbrook and D Kessel. **1983**
Post-operative serum sialyltransferase levels and prognosis in breast cancer
Brest Cancer Res. and Treatment **3** : 225-230.

- Taatjes DJ, J Roth, J Weinstein and JC Paulson. **1988**
 Post-Golgi apparatus localization and regional expression of rat intestinal sialyltransferase detected by immunoelectron microscopy with polypeptide epitope-purified antibody
J. Biol. Chem. **263** : 6302-6309.
- Tabin CJ, SM Bradley, CI Bargmann, RA Weinberg, AG Papageorge, EM Scolnick, R Dhar, DR Lowy and EH Chang. **1982**
 Mechanism of activation of a human oncogene
Nature **300** : 143-149.
- Taparowsky E, Y Suard, O Fasano, K Shimizu, MP Goldfarb and M Wiggler. **1982**
 Activation of T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change
Nature **300** : 762-765.
- Taparowsky E, K Shimizu, M Goldfarb and M Wiggler. **1983**
 Structure and activation of the human N-ras gene
Cell **32** : 881-890.
- Touchot N, P Chardin and A Tavitian. **1987**
 Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy : molecular cloning of YPT-related cDNAs from a Rat brain library
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 8210-8214.
- Trahey M, G Wong, R Halenbeck, B Rubinfeld, GA Martin, M Ladner, CM Long, WJ Crosier, K Watt, K Kothe and F Mc Cormick. **1988**
 Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta
Science **242** : 1697-1700.
- Trinchera M and R Ghidoni. **1989**
 Two glycosphingolipid sialyltransferases are localized in different sub-golgi compartments in Rat liver
J. Biochem. **264** : 15766-15769.
- Tuppy and Gottschalk. **1972**
 in "Glycoproteins" their composition structure and function- 2nd ed., Elsevier Publishing Co., Amsterdam. pp 403-409.
- Ullrich A and J Schlessinger. **1990**
 Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity
Cell **61** : 203-212.
- Urumow T and OH Wieland. **1990**
 A small G-protein involved in phosphatidylinositol-4-phosphate kinase activation
FEBS lett. **263** : 15-17.
- Varmus H. **1988**
 Retroviruses
Science **240** : 1427-1435.
- Vennström B and R Bravo. **1987**
 Anchorage-independent growth of v-myc-transformed Balb/c3T3 cells is promoted by platelet-derived growth factor or co-transformation by other oncogenes
Oncogene **1** : 271-276.
- Verbert A, R Cacan and R Cecchelli. **1987**
 Membrane transport of sugar donors to the glycosylation sites
Biochimie **69** : 91-99.
- Wang XC, TP O'Hanlon and JTY Lau. **1989**
 Regulation of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone
J. Biol. Chem. **264** : 1854-1859.

- Warren L, JP Fuhrer and CA Buck. 1972
Surface glycoproteins of normal and transformed cells : a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyltransferase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69** : 1838-1842.
- Warren L, CA Buck and GP Tuszynski. 1978
Glycopeptide changes and malignant transformation a possible role for carbohydrate in malignant behavior
Biochim. Biophys. Acta **516** : 97-127.
- Wasylyk B, C Wasylyk, P Flores, A Begue, D LePrince and D Stehelin. 1990
The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-fos and c-jun for transcriptional activation
Nature **346** : 191-193.
- Watkins WM. 1986
Glycosyltransferases early history development and future prospects.
Carbohydr. Res. **149** : 1-12.
- Weinberg RA. 1985
The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus
Science **230** : 770-776.
- Weinstein J, U de Souza-e-Silva and JC Paulson. 1982
Purification of a Gal β 1-->4GlcNAc α 2-->6 sialyltransferase and a Gal β 1--->3(4)GlcNAc α 2-->3 sialyltransferase to homogeneity from Rat liver
J. Biol. Chem. **257** : 13835-13844.
- Weinstein J, U de Souza-e-Silva and JC Paulson. 1982
Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine
J. Biol. Chem. **257** : 13845-13853.
- Weinstein J, EU Lee, K McEntee, PH Lai and JC Paulson. 1987
Primary structure of β -galactoside- α 2,6-sialyltransferase
J. Biol. Chem. **262** : 17735-17743.
- Weiser MM, WD Klohs, DK Podolsky and JR Wilson. 1982
Glycosyltransferases in Cancer
Glycoconjugates **4** : 301-333.
- Whiteheart SW and GW Hart. 1987
Sialyltransferase as specific cell surface probes of terminal and penultimate saccharide structures on living cells
Anal. Biochem. **163** : 123-135.
- Wigler M, R Sweet, GK Sim, B Wold, A pellicer, E Lacy, T Maniatis, S Silverstein and R Axel. 1979
Transformation of Mammalian cells with genes from Procaryotes and Eucaryotes.
Cell **16** : 777-785.
- Willis RA and SA Willis. 1972
in "principles of pathology and bacteriology" 3rd Edn, Butterworth, London.
- Wolfman A and IG Macara. 1990
A cytosolic protein catalyses the release of GDP from p21^{ras}
Science **248**, 67-69.
- Yamashita K, T Ohkura, Y Tachibana, S Takasaki and A Kobata. 1984
J. Biol. Chem. **259** : 10834-10840.

- Yatani A, Okabe K, Polakis P, Halenbeck R, McCormick and AM Brown. 1990
Ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K⁺ channels
Cell **61** : 769-776.
- Yehekel AS, R Krishnaraj and RG Kemp. 1981
Glycolipid sialyltransferases in normal and neoplastic murine thymocytes.
Biochim. Biophys. Acta **678** : 213-220.
- Yogeeswaran G and P Salk, 1981
Metastatic potential is positively correlated with cell-surface sialylation of cultured murine tumor cell lines
Science **212** : 1514-1516.
- Yogeeswaran G, BS Stein and H Sebatian. 1978
Altered cell-surface organization of gangliosides and sialylproteins of mouse metastatic melanoma variant selected *in vivo* for enhanced lung colonization
Cancer Res. **38** : 1336-1344.
- Yu RK and RW Ledeen. 1970
Gas-liquid chromatographic assay of lipid bound sialic acids : measurement of gangliosides in brain of several species
J. Lipid. Res. **11** : 506-516.
- Zhang K, M Noda, WC Vass, AG Papageorge and D Lowy. 1990
Identification of small clusters of divergent amino-acids that mediate the opposing effects of ras and Krev-1
Science **249** : 162-168.

APPENDICE TECHNIQUE

I - CULTURE CELLULAIRE ET ANALYSES

A. MILIEUX ET SOLUTIONS POUR LA CULTURE CELLULAIRE

1. Milieu D 10 FCS

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

2. Solution VT (Versène-Trypsine)

A 10 litres de Versène (EDTA 12,5 g NaCl 80 g KCl 2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 28,7 g K_2HPO_4 2g NaOH 1 N 10 ml H_2O q.s.p. 10 l) stérile, on ajoute 10 g de trypsine (Difco 1/250), 10 ml d'une solution de NaOH 1 N stérile, 1 ampoule de Gentalline (Unilabo, 80 mg), 25 mg de Fungizone (Squibb) et 2 ml de solution aqueuse stérile de rouge de phénol à 1% (p:v). La solution est stérilisée par filtration (voir ci-dessus) et partagée en flacons de 250 ml conservés à 4°C pendant un mois au maximum.

3. Milieu de congélation

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

B. CULTURE DE CELLULES

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

1. Mise en culture d'une souche congelée

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

2. Entretien d'une souche

La boîte de Pétri à diviser est placée sous la hotte. Le milieu est aspiré et le tapis cellulaire rincé par 5 ml de solution VT, aussitôt aspirée afin d'éviter le décollement. On ajoute alors 1 ml de solution VT et on laisse reposer quelques minutes. Les cellules sont ensuite mises en suspension en tapotant le bord de la boîte et reprises à la pipette dans du milieu de culture de manière à disperser d'éventuels agrégats et à inactiver la trypsine. La suspension cellulaire est répartie dans de nouvelles boîtes contenant du milieu, placées aussitôt dans l'incubateur à CO₂. A titre d'exemple, une division au tiers est effectuée en reprenant la boîte-mère par 8 ml de milieu et en répartissant les 2 ml résultant en 3 boîtes contenant chacune 7 ml de milieu ; le volume final dans chaque boîte est de 10 ml.

3. Production de cellules en masse

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

4. Comptage des cellules

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

5. Congélation d'une souche

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

6. Microscopie et photographie des cultures

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

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

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

C. TECHNIQUE D'ANALYSE DES ARNs MESSAGERS (NORTHERN BLOT)

1. Extraction des ARNs

Les cellules sont lavées par du PBS puis centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, le culot est ensuite repris par 9 ml de tampon guanidium : guanidine thiocyanate 4,7M, acétate de sodium 0,02M, sarcosinate de sodium 0,5%, Tris-HCl 0,05M, β mercapto-éthanol 0,1M (la solution est filtrée sur $0,22 \mu\text{m}$ et stockée à l'abri de la lumière).

L'échantillon est broyé à l'ultraturax 3 fois 30 secondes. Le broyat est alors centrifugé pendant 20 min à 10 000 rpm, le surnageant (comportant les ARNs) est récupéré.

2. Centrifugation sur coussin de césium

Dans des tubes de SW4, 2 ml de coussin de césium sont déposés (CsCl 5,7M, acétate de sodium 0,25M). L'échantillon est coulé délicatement sur le coussin de césium puis centrifugé pendant 18 heures à 27,000 rpm à 18°C . Le culot est récupéré puis séché durant 15 min à l'air libre. Les ARNs

sont repris dans 600µl d'eau préalablement autoclavée à 140°C pendant 45 min, puis dissous à 50°C. Ils sont alors précipités avec 1/10 de volume d'acétate de Na 2M pH 5,5 et 2,5 volumes d'éthanol et conservés à -70°C.

Après centrifugation les ARNs sont quantifiés avec un spectrophotomètre à 260 nm. L'état de dégradation de ces ARNs est évalué sur minicuve d'agarose.

a. Electrophorèse-test

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

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

b. Gel d'agarose dénaturant

La formamide et le formaldéhyde sont préalablement désionisés. Le gel d'agarose en milieu dénaturant est préparé dans les conditions suivantes : agarose 1,8 g, H₂O 109,2 g, MOPS 10X 15ml, formaldéhyde 25,5ml, (MOPS 10X : N-Morpholino propane sulfonic acide 10,0 g ; Acétate de Na 2M 6,3 ml ; EDTA 0,5M 5,0 ml; eau qsp 250 ml ; pH 7,0 ; filtrer sur 0,22µl).

30 µg d'ARN sont repris dans 50 µl de tampon de dénaturation : formamide 500 µl; formaldéhyde 178 µl; MOPS 10X 100 µl; eau 222 µl.

Les échantillons sont incubés pendant 5 min à 68°C, le bleu de charge et le Bromure d'Ethidium sont ensuite ajoutés. La migration est réalisée dans un tampon MOPS 1X à 25 V à température ambiante pendant une nuit.

3. Transfert sur nitrocellulose

Les ARNs sont transférés sur une feuille de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham) par la technique de Southern ("Southern blotting") (Maniatis *et al.*, 1982) :

Le gel est rincé à l'eau courante pendant une heure et le transfert est réalisé dans les conditions suivantes en présence d'un tampon SSC 20X (citrate trisodique 0,3 M NaCl 3 M).

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

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

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

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

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

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

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

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

La radioactivité de la sonde est alors mesurée en plaçant 10 μl dans un tube auquel on ajoute 150 μl d'eau, 50 μl d'ADN entraîneur et 1 ml du tampon PCA ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 180 g acide perchlorique concentré 200 ml H_2O q.s.p. 1 l). Après 5 min à 20°C, l'échantillon est filtré (filtre de fibre de verre préalablement mouillé avec de l'acide chlorhydrique à 0,1 % et rincé à l'éthanol) ; le filtre est rincé à l'éthanol et séché, puis introduit dans une fiole de comptage à laquelle est ajouté le liquide de scintillation (Ready - Safe, Beckman).

5. Hybridation moléculaire

Une étape de préhybridation avec du tampon seul est nécessaire afin de saturer les sites de fixation aspécifique de la sonde sur la feuille de nitrocellulose. Le tampon utilisé pour la préhybridation et l'hybridation est préparé (10 ml) comme suit : formamide 5 ml ; HEPES 1 M de pH 7 ; 0,5 ml SSC 20X ; 1,5 ml solution Denhardts (sérum albumine bovine, 4 %; Ficoll 400 4 % ; polyvinylpyrrolidone 4 %) 1 ml d'ADN entraîneur en solution à 5 mg/ml et H_2O en q.s.p. 10 ml.

La feuille de nitrocellulose est placée dans un sachet de cellophane. Le tampon de préhybridation est ajouté, puis le sachet est soudé et placé à 42°C pendant 30 min. La sonde est alors ajoutée à raison de 10^7 cpm par "blot", le sachet est soudé à nouveau et placé à 42°C pendant 24 à 48 h.

6. Autoradiographie

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

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

D. ANALYSE PROTEIQUE

1. Marquage métabolique des cellules par la méthionine ^{35}S

a Culture des cellules

Les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C en atmosphère humide sous 5 % de CO_2 dans du milieu de culture MEM (Eagle) sans méthionine avec 5% de sérum de veau foetal préalablement dialysé.

b Marquage des cellules

Les boîtes sont rincées deux fois avec du milieu ne contenant pas de méthionine à raison de 5 ml pendant 1 mn à chaque fois. Les cellules sont ensuite incubées dans 3 ml du même milieu en présence de 150 μCi L-(^{35}S) méthionine (AS 1000 Ci/mmole) pendant 2 heures.

Les cellules sont lavées 3 fois puis reprises dans du PBS, décollées par grattage et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min.

Le culot cellulaire est lysé dans 1 ml de RIPA 1X.

2. Immunoprécipitation

Composition du TNE : 10 mM Tris pH 7.4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA.

Composition RIPA 1X : TNE 1X - Triton X 100 à 1 % - Déoxycholate de sodium à 0,5 % - SDS à

0,1 % - Trasylol 1 % (Aprotinin de Sigma).

Le lysat est préincubé avec 50 μ l de protéine A-sépharose à 10% dans du RIPA 1X de façon à éliminer les interactions non-spécifiques, 5 μ l de sérum sont ajoutés à 800 μ l de surnageant (100.000 g) et laissés en contact pendant une nuit à + 4°C. Ensuite, 50 μ l de protéine A-sépharose à 50% dans du RIPA 1X sont additionnés et le tout maintenu sous agitation continue pendant 30 mn. L'immuno-adsorbant est ensuite lavé 4 fois par resuspensions successives dans du : RIPA 1X ; RIPA 1X/NaCl ; RIPA 1X/TNE (v/v); TNE.

Après la dernière centrifugation, le culot d'immuno-adsorbant est repris dans 60 μ l du tampon suivant : Tris HCl pH 6,8 50 mM; SDS 5% ; β -mercaptoethanol 10 % ; glycérol 10 % ; bleu de bromophénol 0.05 % puis bouilli pendant 5 mn, centrifugé, et le surnageant déposé sur gel de polyacrylamide et les protéines séparées par électrophorèse.

3. Electrophorèse

L'électrophorèse a lieu pendant une nuit sous une différence de potentiel de 60 Volts (voltage constant). Juste avant le démoulage, la migration est accélérée pendant 30 minutes à 20 milli-ampères (ampérage constant).

Composition du tampon d'électrophorèse

Glycine = 28,8 g ; Tris = 6,06 g ; SDS = 0,10 % final ; H₂O qsp 2 l

4. Traitement du gel

Après l'électrophorèse, le gel est déposé pendant une heure dans un bain de fixateur. Cette étape est suivie de deux bains de 30 minutes dans du DMSO puis d'un bain DMSO/PPO (226 g de PPO pour 1 litre de DMSO) d'environ deux heures. L'excès de DMSO/PPO est éliminé sous courant d'eau pendant plusieurs heures. Enfin, le gel est séché puis autoradiographié.

II - CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES DE SURFACE CELLULAIRE

A. IDENTIFICATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES PAR DES LECTINES RADIO-MARQUEES

1- Radio-iodation des lectines

Le marquage des lectines par l'¹²⁵I est réalisé par la méthode à l'Iodogen (1;3;4;6-tétrachloro 3a, 6a-diphénylglycoluril, PIERCE) décrite par Fraker et Speck (1978).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100 mg d'Iodogen en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg/ml, par évaporation du chloroforme sous un courant d'azote. Le marquage est effectué par addition de 2 μ l d'I¹²⁵S30 (5 mCi/50 μ l ; Amersham) à la solution de lectine (300 μ l à 1 mg/ml dans du tampon PBS) placée dans le tube contenant l'Iodogen. La solution d'I¹²⁵I radioactive est alors ajoutée et le tube est placé dans la glace, sous agitation douce, pendant 15 minutes. Les lectines marquées sont séparées de l'iode en excès par dessalage sur une colonne de Séphadex G25 équilibrée dans une solution de BSA à 1 % dans le PBS.

2.Solubilisation des protéines membranaires

10⁶ cellules environ sont mises en suspension dans 200 μ l de tampon PBS, Triton X100 1%, PMSF 5 mM DTT 5 mM. La solubilisation des protéines membranaires est réalisée à 4°C pendant 30 minutes sous agitation, puis la solution est centrifugée à 1500 rpm pendant 15 minutes. Un volume équivalent de tampon Tris/HCl 0,3 M pH 8,9 ; 5 % SDS ; β -mercapto-éthanol ; 20 % glycérol contenant du bleu de bromophénol comme marqueur de migration est mélangé avec le surnageant.

3.Séparation des glycoprotéines en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant

L'électrophorèse en gel polyacrylamide en présence de SDS est effectuée dans les conditions suivantes. Le gel de séparation est réalisé dans un gradient de concentration de 5 à 25 %, le gel de concentration étant à 5 %. Des témoins de masse moléculaires provenant de la firme Pharmacia "Low Molecular Weight Calibration Kit Proteins", composition et masse moléculaire : la phosphorylase b (94.000), l'albumine (67.000), l'ovalbumine (43.000), l'anhydrase carbonique (30.000), l'inhibiteur trypsique (20.100) et la lactalbumine (14.000). Les échantillons sont préalablement portés à ébullition pendant 5 minutes.

Après l'électrophorèse, les protéines sont soit colorées par le bleu de Comassie, soit transférées sur feuille de nitrocellulose.

Remarque : le volume de charge des échantillons est déterminé préalablement de façon à avoir la même quantité de protéines dans chaque puit ; pour cela la quantité de protéines de chaque homogénat est déterminée préalablement par la méthode de Bradford.

4. Visualisation des glycoprotéines par incubation avec les lectines radiomarquées

Les protéines séparées par électrophorèse en PAGE-SDS, sont ensuite transférées par électrotransfert sur une feuille de nitrocellulose dans du tampon Tris 25 mM, glycolle 192 mM,

pH 8,4 contenant 20 % de méthanol (V/V) selon la méthode décrite par Tourbin et al. 1979.

L'électrotransfert est réalisé à 120 mA à 4°C pendant une nuit.

Après l'électrotransfert, la feuille de nitrocellulose est placée dans 20 ml de TBS à 0,05 % de Tween 20 et 10^7 cpm de lectine ^{125}I . L'incubation est réalisée à température ambiante durant 2 heures sous agitation lente. Ensuite, la réaction est bloquée par du TBS à 2 % de Tween 20 pendant 30 minutes. La nitrocellulose est lavée 3 fois par du TBS 0,05 % de Tween 20 puis par du TBS. La feuille de nitrocellulose est alors séchée et les bandes marquées sont visualisées par autoradiographie à -70°C pendant 24 heures en utilisant un film Kodak X AG-5.

B. ETUDES DES MODIFICATIONS DE SIALYLATION DE LA SURFACE CELLULAIRE PAR DES LECTINES MARQUEES A LA FLUORESCEINE EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE

1. Marquage des lectines au FITC

1 ml d'une solution de lectine à 2 mg/ml dans du carbonate de sodium 0,1 M (pH 9) est mélangé à 50 μl d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) solubilisé dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Ces deux solutions sont préparées extemporanément. La réaction est réalisée à 4°C pendant 8 heures sous agitation douce. La réaction est arrêtée par du NH_4Cl 50 mM final et incubée pendant 2 heures à 4°C. Ensuite, du Xylène Cylard 0,1 % et du glycérol 5 % sont ajoutés de façon à stabiliser le produit. La FITC libre est éliminée par plusieurs dialyses successives dans du PBS (3 jours) à 4°C et à l'obscurité sous agitation continue. Le taux de couplage de FITC sur la lectine est estimé par mesure de l'absorbance à 495 nm et à 280 nm. Le rapport des absorbances doit être compris entre 0,3 et 1,0.

2. Marquage des cellules par la lectine-FITC

Des cellules sont incubées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre préalablement recouvertes de gélatine de façon à permettre une meilleure adhésion des cellules. A 50 % de confluence, les cellules sont traitées par du paraformaldéhyde (PAF) à 4 % dans du PBS (permettant leur fixation sur le support), 1 heure à température ambiante. Le PAF est ensuite éliminé et la réaction est bloquée par du NH_4Cl pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules fixées sont ensuite incubées dans une solution de FITC-lectine 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du PBS seul, ou comprenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'orosomucoïde comme compétiteur. L'incubation est réalisée durant 30 minutes à température ambiante. L'excès de FITC-lectine est éliminé par plusieurs lavages successifs avec du PBS. Les lamelles sont alors montées dans une goutte de solution de 15 % vinol 205 polyvinol alcool, 33 % glycérol, 0,1 % d'azide de sodium dans 100 mM de Tris pH 8,5. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Microscope Zeiss IM 35 ; boîtier à exposition automatique contax ; les photographies sont prises par un appareil Pentax ME automatique ; pellicule Kodak Trix 400 ASA révélateur et fixateur Kodak ; papier de tirage Ilford Multigrade 3).

III - DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A. DOSAGE DE L'HYDROXYLASE

1. Homogénéisation

Des glandes sous-maxillaires de porc, tissu très riche en hydroxylase, nous serviront de témoin à la réaction. Le tissu est haché en petits morceaux, puis ajouté dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4 de façon à obtenir un rapport de 1 mg de tissu/2 ml de tampon. Le tissu est ainsi broyé à l'ultraturax 4 fois pendant 30 secondes. Les homogénats sont alors ultracentrifugés pendant 1 heure à 120 000 g. Le surnageant, contenant l'hydroxylase, est soigneusement récupéré et stocké à - 70°C (Shaw et Schawer, 1988). Les cellules cultivées *in vitro*, sont lavées plusieurs fois au TBS, puis lysées dans du Tris/HCl pH 7,4 50 mM Triton X100, pMSF 0,1 mM et aprotinine 0,001 %.

2. Incubation

A 250 µl d'homogénat, sont ajoutés 2 µl de CMP-Neu5Ac (190 pmoles ; 50 mCi) et 25 µl d'un mélange de cofacteurs (NaOH 50 mM ; FeSO₄ 10 mM ; Vitamine C 20 mM). L'incubation est réalisée à 37°C.

3. Séparation des acides sialiques Neu5Ac et Neu5Gc

Les protéines de chaque aliquot de milieu réactionnel sont précipitées par l'addition de 4 volumes d'éthanol à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est repris et évaporé sous vide à l'aide d'un speed vac. Le produit sec est repris par 50 µl d'HCl 0,1 N permettant l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac. Le Neu5Ac et le Neu5Gc sont séparés par chromatographie descendante de partage sur papier Whatman N°3 dans du solvant M-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N dans les rapports 2/1/1 pendant 20 heures. Le profil de migration est déterminé par la quantité de radioactivité comptée tous les cm (pour cela la bande de migration est découpée tous les cm et chaque morceau est immergé dans une dilution contenant du lipofluor).

B. DOSAGE DES SIALYLTRANSFERASES

1. Préparation des homogénats cellulaires

Des cellules sont cultivées à confluence, lavées 3 fois par du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4 NaCl 0,154 M (TBS) et sont décollées de la boîte. La totalité des cellules est centrifugée à 1 500 g pendant 5 minutes et lavée deux fois dans du tampon cacodylate 50 mM/NaCl 0,154 M pH 6.5 (tampon A).

Les cellules sont homogénéisées dans du tampon cacodylate 50 mM pH 6,5 NaCl 0,154 M, Triton X100 1 % glycérol 20 % à 4 °C.

Les particules insolubles sont éliminées par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 10 000 g. Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford (Biorad).

2. Incubation

A 100 µl d'homogénat cellulaire sont ajoutés 100 µl d'un mélange de réactifs comprenant 8 µl de CMP-[¹⁴C]- Neu5Ac (soit 0,69 mmoles ; 4,4 105 ppm), 15 µl de CMP-NeuGAc froid 10 mM (30 mmoles) ; 5 µl 2,3-déhydro-2deoxy-Neu5Ac 10 mM, 20 µl de galactose 2 M, 10 µl du tampon A 10 fois concentré, 20 µl d'une solution d'accepteur comportant 20 mM de galactose terminaux, et 32 µl H₂O. Le 2,3-déhydro-2-désoxy-Neu5Ac est un inhibiteur des neuraminidases à une concentration finale de 0,5 mM. Le galactose intervient comme inhibiteur des galactosidases susceptibles de dégrader l'accepteur et inhibe ces enzymes à une concentration finale de 0,2 M (Delannoy et al., 1987).

L'incubation est réalisée à 37°C. La réaction est arrêtée à 4°C.

3. Préparation des accepteurs

Les accepteurs glycoprotéïques tels que l'asialofétine et l'asialo-orosomucoïde, sont obtenus après hydrolyse acide dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N à 80°C pendant 1 heure. La réaction est neutralisée par l'addition d'un 1/10 de volume de NaOH 1 N. La glycoprotéine est alors soumise à plusieurs dialyses contre de l'eau à 4°C sous agitation de façon à éliminer l'acide sialique libre. Le produit est ensuite lyophilisé puis analysé en CPG après méthanolyse (O5W 24 H) et dérivation par triméthylsilylation, de façon à déterminer la quantité de galactose terminale/mg de protéine. La préparation de glycopeptides de l'asialosérototransferrine humaine se fait par une digestion pronasique. Les glycopeptides sont ensuite purifiés par chromatographie d'échange d'ions, puis par chromatographie d'affinité sur ConA-sépharose (qui retient spécifiquement les glycopeptides de type bi-antennés).

La désialylation est réalisée par hydrolyse acide par de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 N à 80°C pendant 35 minutes. Le TFA est ensuite éliminé par évaporation sous vide et le Neu5Ac libre est éliminé par chromatographie d'échange d'ions sur Dowex 1x2 (200-400 mesch, Formate) suivie d'une gel-filtration sur colonne de Biogel P2 équilibré dans l'eau. Les oligosaccharides mono-antennés nous ont été gracieusement offerts par Gérard Strecker.

4. Détermination du taux de transfert

a - Accepteurs asialoglycoprotéiniques

Les protéines du mélange réactionnel sont précipitées par de l'acide phosphotungstique 5 % dans de l'HCl/2N, le précipité est filtré sur filtre de fibres de verre puis rincé 2 fois au TCA 5%, 2 fois par de l'eau puis par de l'éthanol. Les filtres sont séchés puis placés dans un pilulier contenant du lipofluor et la radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

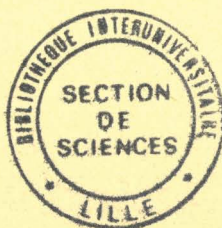
b - Accepteurs glycopeptidiques

Le mélange réactionnel est déposé sur du papier Whatman N°3 et la migration est réalisée par chromatographie descendante dans du solvant Pyridine/Acétate d'éthyle/Acide acétique/Eau dans les proportions 5/5/1/3 pendant 20 heures.

Les glycopeptides (ne migrant pas) sont ainsi séparés du CMP[¹⁴C]-Neu5Ac et du [¹⁴C]-Neu5Ac. Le papier Whatman est découpé au niveau des glycopeptides puis compté.

c - Accepteurs oligosaccharidiques

Les fractions du mélange réactionnel sont portées à ébullition pendant 10 minutes, permettant une hydrolyse complète du CMP-Neu5Ac ainsi qu'une précipitation des protéines, puis sont centrifugées à 3 000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants sont déposés sur chromatographie papier et les différents produits sont séparés par chromatographie descendante dans du solvant 5/5/1/3 pendant 4 jours.



RESUME

Parmi les modifications du métabolisme cellulaire induites par la transformation maligne, l'une des plus marquantes est l'altération de la glycosylation des glycoconjugués de la surface cellulaire qui se caractérise par une simplification des glycannes des glycolipides et une augmentation de la taille des glycannes des N-glycosylprotéines, liée à une multi-antennarisation et à une hypersialylation de ces structures. Ces réarrangements structuraux sont liés à une dysrégulation des activités glycosyltransférasiques.

Afin de définir les raisons de ces modifications structurales et, en particulier de l'hypersialylation, nous nous sommes intéressés aux sialyltransférases, spécifiques des N-glycosylprotéines.

Nous avons utilisé comme modèle cellulaire des fibroblastes de rein de Hamster (BHK) transformés par l'oncogène ras et des fibroblastes de Rat (FR3T3) transformés par différents oncogènes parmi lesquels l'oncogène ras. Nous avons montré que la transformation cellulaire par l'oncogène ras conduisait à une augmentation des activités sialyltransférasiques, et en particulier, celle de la Gal-alpha-2,6-sialyltransférase dans les FR3T3. Nous avons caractérisé l'expression de cette enzyme d'une part, par cyto-immunofluorescence et par immunoprécipitation en utilisant des anticorps spécifiques de cette transférase et, d'autre part, au niveau transcriptionnel en utilisant une sonde d'ADN complémentaire de l'ARNm. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que l'augmentation de l'activité enzymatique observée était la conséquence d'un accroissement de l'expression de l'enzyme. Celle-ci se traduit par une hypersialylation qui se manifeste par une augmentation du nombre des séquences Neu5Ac(alpha2-6)Gal à la surface des cellules, augmentation mise en évidence par l'agglutinine de *Sambucus nigra* (SNA) spécifique de ce motif structural.

MOTS CLES :

Transformation cellulaire - Fibroblastes - Oncogène ras - Sialyltransférases - Gal-alpha2,6-sialyltransférase - *Sambucus nigra* agglutinine (SNA) - Cyto-immunofluorescence - Immunoprécipitation.