

50376
1993
161

50376
1993
161

N° d'ordre 1153

de

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

LABEL EUROPEEN

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée par



Valérie VANDAMME



Régulation des sialyltransférases

- Comparaison des activités α -1,3-galactosyl- et sialyltransférasiques des cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène ras : augmentation de l'activité de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase.
- Régulation par la dexaméthasone de la transcription de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase des fibroblastes de Rat.
- Activités sialyltransférasiques des cellules FR3T3 transformées par l'oncogène ras : diminution de l'activité de la CMP-NeuAc: Gal β 1,3GalNAc: α -2,3-sialyltransférase.

Soutenue le 9 juillet 1993 devant le Commission d'Examen :

Rapporteurs : Docteur M. Aubery (Paris, France)
Professeur R. Schauer (Kiel, Allemagne)
Professeur D. van den Eijnden (Amsterdam, Pays-Bas)

Examineurs : Docteur S. Kelm (Kiel, Allemagne)
Docteur S. Kelm (Kiel, Allemagne)
Docteur P. Delannoy (Villeneuve d'Ascq, France)

Président : Professeur A. Verbert (Villeneuve d'Ascq, France)



030 050386 0

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur le Docteur
Philippe DELANNOY au sein du Laboratoire de Chimie Biologique de
L'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte du C.N.R.S.
n°111, Relations Structure-Fonction Des Constituants Membranaires).

A ma Grand-Mère

Mamie B.

REMERCIEMENTS

Rainer

Ich danke Dir vielmals für Deine Seelenstärke und Deine Heiterkeit, die Du mir in schwierigen Augenblicken übertragen hast. Deine Liebe hat mir Selbstvertrauen gegeben und mir ermöglicht, jeder drohenden Panik standzuhalten. Ich widme Dir diese Doktorarbeit als Zeichen meiner Liebe und Dankbarkeit.

André Verbert

Je tiens tout d'abord à te remercier d'être le Président du Jury de cette Thèse. Ensuite, je tenais également à te dire combien ton regard clair et critique sur la Recherche, mais aussi sur la Vie, m'a souvent permise de "reposer les pieds sur terre". Enfin, merci aussi pour la confiance que tu as eu en moi.

Philippe Delannoy

Jamais je n'oublierai l'équipe soudée que nous avons formée dans le travail. Tu as été mon Professeur et que cette Thèse puisse être l'occasion pour l'élève de rendre hommage à tes qualités professionnelles et de te dire "Merci !".

Jean Montreuil

Vous avez su me transmettre votre passion pour la Biochimie. Dans mon entrée dans la vie de chercheur, vous avez été en quelque sorte mon "Père spirituel" en étant à mes côtés comme on peut l'être auprès d'un enfant qui fait ses premiers pas et pour cela je vous remercie.

Elfriede und Roland Schauer

Ich möchte mich besonders und ganz herzlich bedanken bei Elfriede und Roland Schauer für die freundliche Beratung und tatkräftige Unterstützung während meiner Arbeiten in der Christian Albrecht Universität in Kiel. Ihnen beide habe ich es zu verdanken, daß nicht nur meine Arbeit, sondern der Aufenthalt selbst in Norddeutschland zwischen Nord- und Ostsee mir nachhaltig in Erinnerung bleiben wird....

Sorge Kelm

Bei dir, Sorge, möchte ich mir für die vielen langen und manchmal harten Diskussionen doch aufrichtig bedanken, auch wenn wir manchmal aneinander geraten sind. Rückwirkend betrachtest Du mir doch - und das nicht nur in der Universität - sondern auch in langen abendlichen Gesprächen, unendlich viel Mühe und Aufmerksamkeit gespendet. Du warst als Gastgeber der Richtige - Danke Sorge.

Annick Pierce et Monique Benaïssa

Je tenais à vous remercier toutes les deux car vous m'avez offert beaucoup de votre temps et surtout de votre gentillesse pour m'initier aux pratiques de la biologie moléculaire. Je vous remercie également pour les nombreux conseils que vous m'avez prodigués.

Odette Labiau

J'ai eu grand plaisir à travailler à vos côtés. Vous m'avez initié à la culture cellulaire avec la rigueur et la patience qui vous caractérisent. Je vous en remercie.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	8

INTRODUCTION	11

ABRIDGED ENGLISH VERSION	15

GENERALITES	
I - LES ONCOGENES	18
I - RETROVIRUS ONCOGENES ET PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES.	18
II - ONCOGENES ET DEVELOPPEMENT CELLULAIRE.	22
1 - Oncogènes facteurs de croissance.	23
2 - Oncogènes récepteurs de facteurs de croissance.	23
3 - Oncogènes et transmission du signal.	25
a) La phosphorylation.	
b) La stimulation du métabolisme des phosphatidylinositols.	
4 - Oncogènes et facteurs de transcription.	25
III - ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES.	27
1 - Le processus qualitatif d'activation.	27
2 - Le processus quantitatif d'activation.	29
IV - THEORIE UNIFICATRICE DU CANCER.	31
V - CANCEROGENESE MULTI-ETAPES.	32
VI - LES ANTI-ONCOGENES.	36
VII - ONCOGENES ET CANCERS HUMAINS.	38

II - LES ONCOGENES RAS	41
I - STRUCTURE DES PROTEINES RAS.	41
1 - Structure primaire des p21 ^{ras} .	41
2 - Structure tridimensionnelle et organisation en domaines.	43
II - FIXATION A LA MEMBRANE PLASMIQUE.	45
III - ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES <u>ras</u> .	46
IV - PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES <u>ras</u> .	46
V - PROPRIETES BIOCHIMIQUES.	48
1 - Activité GTPasique.	48
2 - Les effecteurs.	48
VI - CONTROLE DE L'ACTIVITE DES p21 ^{ras} ET LE CYCLE GDP/GTP.	51
1 - Régulation négative par les protéines GAP.	51
2 - Régulation positive.	52
3 - Le cycle GDP/GTP.	54
VII - ONCOGENE RAS ET CANCERS HUMAINS.	55
III - LA TRANSFORMATION MALIGNE.	56
1 - Transformation cellulaire <u>in vitro</u> .	58
2 - Invasion et métastases.	58
IV - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES	62
V - LES ACIDES SIALIQUES ET LES SIALYLTRANSFERASES	71
I - LES ACIDES SIALIQUES.	71
1 - Structure des acides sialiques.	71
2 - Les acides sialiques dans la composition des glycoconjugués.	72
3 - Rôles des acides sialiques.	72
a) Rôles physico-chimiques.	
b) Rôles biologiques.	
4 - Sialylation et métastases.	75

II - LES SIALYLTRANSFERASES.	79
A - <u>Structure et localisation des sialyltransférases.</u>	81
1 - Organisation en domaines.	81
2 - Localisation des sialyltransférases.	82
3 - Homologie de séquence des sialyltransférases.	84
B - <u>Expression et spécificité des sialyltransférases.</u>	85
1 - Spécificité.	85
2 - Expression des sialyltransférases en fonction des espèces.	88
3 - Expression tissulaire.	88
III - REGULATION DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES : CAS DE LA β-GALACTOSIDE: α2,6-SIALYLTRANSFERASE.	88
A - <u>Régulation de l'α2,6ST(N).</u>	89
1 - Régulation par la structure de l'accepteur.	89
2 - Régulation tissulaire de l'expression de l'α2,6-sialyl- transférase.	91
B - <u>Organisation génomique et régulation transcriptionnelle du gène de l'α2,6ST(N).</u>	94
1 - Structure du gène codant pour l'α2,6ST(N) de Rat.	94
2 - Organisation génomique de l'α2,6ST(N) humaine.	98
3 - Régulation transcriptionnelle de la forme hépatique de l'α2,6ST(N) de Rat.	100

CONCLUSION

RESULTATS ET DISCUSSION

PUBLICATION I : Comparaison des activités α-1,3-galactosyl- et sialyl- transférasiques des cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène ras : augmentation de l'activité de la β-galactoside α-2,6-sialyltransférase.

Introduction.	105
Publication.	108
Discussion et conclusion.	119

PUBLICATION II : Induction par la dexaméthasone de la transcription de la β-galactoside α-2,6-sialyltransférase de fibroblastes de Rat.

Introduction.	126
Publication.	128
Discussion et conclusion.	134
Effet de la dexaméthasone sur les activités sialyltransférasiques des cellules FR3T3 transformées par transfection de l'oncogène humain c-Ha-ras.	
Introduction.	140
Résultats.	142
A - 1^{ère} Partie : <u>Effet de la dexaméthasone sur l'expression de l'α2,6ST(N) des cellules FRras.</u>	142
1 - Comparaison des activités sialyltransférasiques des cellules <u>FRras</u> et <u>FRrasDex</u> vis-à-vis de l'asialo-orosomucoïde.	142
2 - Effet de la dexaméthasone sur l'activité de l' α 2,6ST(N) et de l' α 2,3ST(N/O) des cellules <u>FRras</u> .	142
3 - La dexaméthasone ne modifie pas la synthèse de l'ARNm de l' α 2,6ST(N) dans les cellules <u>FRras</u> .	144
4 - Sialylation des glycoprotéines des cellules <u>FRras</u> .	146
5 - Dosage des récepteurs des glucocorticoïdes des cellules FR3T3 et <u>FRras</u> .	148
Discussion et conclusion de la première partie.	152
B - 2^{ème} partie : <u>Analyse de la sialylation de l'asialo-fétuine.</u>	156
1 - Cinétiques de transfert de l'acide sialique sur les glycanes de l'asialo-fétuine.	156
2 - Analyse de la sialylation des glycanes de l'asialo-fétuine.	158
Conclusion de la deuxième partie.	159
Etude de l'expression de la Galβ1-3GalNAc α-2,3-sialyltransférase dans les cellules FR3T3.	
Introduction.	161
Résultats et discussion.	162
Conclusion.	168
<hr/>	
CONCLUSION GENERALE	
English version.	171
Conclusion.	187

BIBLIOGRAPHIE

191

APPENDICE TECHNIQUE

I - CULTURES CELLULAIRES.	207
A - <u>Culture des cellules.</u>	207
1 - Préparation du milieu de culture.	
2 - Décongélation d'une souche de cellules.	
3 - Repiquage et entretien d'une souche cellulaire.	
a) Solution de Versène tryptique.	
b) Repiquage des cellules.	
B - <u>Congélation des cellules.</u>	208
C - <u>Culture des cellules en présence de dexaméthasone et/ou de</u>	
 <u>RU 38.486.</u>	209
II - MESURE DES ACTIVITES α1,3-GALACTOSYL- ET SIALYLTRANSFERASIQUES.	
A - <u>Préparation des homogénats cellulaires.</u>	209
B - <u>Détermination de la concentration protéique des homogénats</u>	
 <u>cellulaires.</u>	209
C - <u>Préparation des accepteurs.</u>	210
1 - Désialylation des accepteurs.	
2 - Analyse des accepteurs désialylés.	
D - <u>Détermination des activités α1,3-galactosyl- et sialyltrans-</u>	
 <u>férasiques.</u>	211
1 - Détermination de l'activité α 1,3-galactosyltransférasique.	
2 - Détermination des activités sialyltransférasiques.	
III - β-ELIMINATION DES O-GLYCANNES DE LA FETUINE.	212
A - <u>Détermination du pourcentage de transfert d'acide sialique.</u>	212
B - <u>β-élimination des O-glycannes de la fétuine néosialylée.</u>	212
C - <u>Séparation des O-glycannes β-éliminés.</u>	213
IV - ETUDE DE LA GALACTOSYLATION ET DE LA SIALYLATION DES	
 GLYCOPROTEINES CELLULAIRES.	213
A - <u>Marquage à l'iode des lectines.</u>	213
B - <u>Préparation des homogénats cellulaires.</u>	213
C - <u>Séparation des glycoprotéines cellulaires par électrophorèse</u>	

<u>en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS-PAGE).</u>	214
D - <u>Evaluation de la galactosylation et de la sialylation des glycoprotéines cellulaires.</u>	214
V - ANALYSE DES ARN PAR NORTHERN BLOT.	214
A - <u>Extraction des ARN totaux.</u>	215
B - <u>Electrophorèse en gel d'agarose.</u>	215
C - <u>"Northern-blotting" des ARN.</u>	216
VI - MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATION DES NORTHERN BLOTS.	216
A - <u>Marquage de la sonde de l'α2,6-sialyltransférase et révélation.</u>	216
1 - Marquage de la sonde.	
2 - Hybridation et autoradiographie.	
B - <u>Marquage de la sonde de l'α2,3-sialyltransférase et révélation.</u>	218
1 - Préparation des cellules d'E. coli pour l'électroporation.	
2 - Electroporation.	
3 - Préparation de la sonde de l' α 2,3-sialyltransférase.	
4 - Extraction phénol/chloroforme.	
a) Traitement par la protéinase K.	
b) Extraction phénol/chloroforme.	
5 - Transcription <u>in vitro</u> .	
a) Réaction de rétrotranscription.	
b) Quantification du marquage de l'ARN.	
c) Contrôle de la pureté de la sonde-ARN néo-marquée.	
6 - Hybridation d'un northern-blot avec la sonde ARN marquée à la digoxigénine et révélation.	
C - <u>Marquage de la sonde oligonucléotidique et révélation des messagers codant pour l'α2,3ST(O).</u>	224
1 - Sonde oligonucléotidique utilisée.	
2 - Marquage de la séquence oligonucléotidique.	
3 - Contrôle du marquage de la sonde oligonucléotidique.	
4 - Hybridation moléculaire.	
5 - Marquage de cette même sonde oligonucléotidique au ^{32}P .	
D - <u>Marquage de la sonde actine et révélation.</u>	225
1 - Marquage de la sonde.	
2 - Hybridation.	

VII - DOSAGE DES RECEPTEURS DES GLUCOCORTICOIDES EXPRIMES DANS LES CELLULES FR3T3 ET <u>FRras</u> .	226
A - <u>Cinétiques de fixation de la dexaméthasone par les cellules FR3T3 et FRras.</u>	226
B - <u>Dosage des récepteurs exprimés dans chacune des lignées cellulaires.</u>	227

ABREVIATIONS

α2,6ST(N) : CMP-NeuAc: Gal β 1-4GlcNAc α -2,6-sialyltransférase	
α2,6ST(O)I : CMP-NeuAc: GalNAc α -2,6-sialyltransférase I	
α2,6ST(O)II : CMP-NeuAc: GalNAc α -2,6-sialyltransférase II	
α2,3ST(N/O) : CMP-NeuAc: Gal β 1-3/4GlcNAc α -2,3-sialyltransférase	
α2,3ST(N)II : CMP-NeuAc: Gal β 1-4GlcNAc α -2,3-sialyltransférase	
α2,3ST(O) : CMP-NeuAc: Gal β 1-3GalNAc α -2,3-sialyltransférase	
Ac : Anticorps	GGRP : Guanine nucleotide release protein
ADN : Acide désoxiribonucléique	GRE : Glucocorticoid response element
AEV : Virus du sarcome de l'érythro- blastose aviaire	hsp : Heat shock protein
Ala : Alanine	HSR : Homogeneous staining region
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	IP₃ : Inositol triphosphate
AP-1 : Activating protein 1	kb : Kilo-bases
ARN : Acide ribonucléique	LEC-CAM : Lectin, EGF, complement- cellular adhesion molecule
ASFet : Asialo-fétuine	LTR : Long terminal repeat
ASOR : Asialo-orosomucoïde	Man : D-Mannose
ASV : Avian Sarcoma Virus	MAP : Mitogene activated protein
CHO : Chinese hamster ovary	MMTV : Virus de la tumeur mammaire de la Souris
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	NCAM : Neural cell adhesion molecule
Cys : Cystéine	Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique
DAG : Diacylglycérol	Neu5Gc : Acide N-glycolylneurami- nique
dpm : Désintégrations par minute	p : Bras court de chromosome
ECR : Expanded chromosome region	PDGF : Platelet derivated growth factor
EGF : Epidermal growth factor	Pi : Phosphore inorganique
ELAM : Endothelial leukocyte adhesion molecule	PIP₂ : Phosphatidylinositol biphosphate
NF1 : Neurofibromatosis Type 1	PDE : Phosphodiesterase
CSF1 : Colony stimulating factor 1	PKC : Phosphokinase C
Fuc : L-Fucose	pNP : para-nitrophéno
Gal : D-Galactose	Pro : Proline
GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine	q : Bras long de chromosome
GAP : GTPase-activating protein	RCA : Lectine de graine de Ricin
GDP : Guanosine diphosphate	RER : Réticulum endoplasmique
Glc : D-Glucose	
GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine	
Gln : Glutamine	
Glu : Acide glutamique	
Gly : Glycine	
GTP : Guanosine triphosphate	

rugueux

RSV : Rous Sarcoma Virus

Ser : Sérine

S-Le^X : Antigène sialyl-Lewis^X

SNA : Sambucus nigra agglutinin, lectine de Sureau

SSV : Virus sarcomateux du Singe

TGF- α : Tumor growth factor α

Thr : Thréonine

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TPA : 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate

TRE : TPA-response element

WGA : Wheat germ agglutinin, lectine de germe de Blé

"Le mot cancer englobe une grande variété de maladies qui, quoique différentes, se caractérisent toutes par le fait que des cellules se mettent à se multiplier alors qu'elles ne le devraient pas. ... nous ne savons pratiquement rien des facteurs moléculaires qui assurent au bon moment, l'arrêt de la croissance et de la division des cellules. C'est pour cette raison que beaucoup de biochimistes, et non des moindres, soutiennent que le temps n'est pas encore venu de s'attaquer sérieusement à la biochimie des cellules cancéreuses. Bien que les cellules cancéreuses soient la cause de grandes souffrances humaines, il est illogique, disent-ils, de faire porter une part démesurée de notre effort scientifique sur un problème qui n'est pas encore mûr pour une solution. Et ils vont jusqu'à comparer la situation actuelle au désir prématuré de comprendre la nature de l'énergie solaire à l'époque de Newton."

James D. Watson (1973)

INTRODUCTION

Il est largement reconnu actuellement que les glycanes des glycoconjugués membranaires, de par leur localisation à la surface externe des cellules, jouent un rôle primordial dans les événements biologiques tels que la différenciation, l'adhésion, la reconnaissance et la mobilité cellulaire. Ainsi, les modifications structurales de ces glycanes qui apparaissent dans des phénomènes physiologiques et/ou pathologiques ont des conséquences sur le comportement cellulaire. En particulier, lors de la transformation maligne, qu'elle soit induite par voie chimique, physique, virale ou encore par transfection d'oncogènes, les modifications glycaniques observées, similaires à celles observées au niveau de cellules isolées de tumeurs malignes, sont directement en relation avec le pouvoir tumorigène, invasif et métastatique de ces cellules. Dans le cas des N-glycosylprotéines, ces modifications se traduisent par une hypersialylation et par une augmentation du nombre et/ou de la longueur des antennes des glycanes.

Toutes ces modifications sont le résultat de variations des activités des glycosyltransférases, enzymes golgiens qui catalysent le transfert de monosaccharides à partir d'un donneur (glycosynucléotide) sur un accepteur (glycoprotéine ou glycolipide).

Compte tenu de ces données, il nous est apparu essentiel d'étudier les mécanismes qui régissent ces variations de la glycosylation. Or, si à l'heure actuelle quelques glycosyltransférases ont été clonées, on ne possède encore que très peu d'information quant à leur régulation. C'est dans ce cadre particulier que nous nous sommes intéressée à l'étude des activités glycosyltransférasiques de cellules fibroblastiques transformées par l'oncogène ras. Plus particulièrement, nous avons tenté d'aborder l'étude de la régulation génique de glycosyltransférases

particulières : les sialyltransférases, enzymes impliqués dans la glycosylation terminale des glycanes. Nous nous sommes surtout focalisée sur l'étude de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase (EC 2.4.99.1) et de la Gal β 1,3GalNAc α -2,3-sialyltransférase (EC 2.4.99.4), enzymes qui transfèrent des résidus d'acide sialique en position terminale non réductrice des glycanes respectivement liés N- et O-glycosidiquement.

Dans la partie "Généralités", après une brève revue concernant les oncogènes en général, nous décrivons l'oncogène ras, que nous avons utilisé pour les transformations cellulaires, ainsi que ses propriétés biologiques et biochimiques. D'autre part, après un rappel des différentes propriétés des acides sialiques, nous avons ensuite tenté de donner les informations les plus récentes concernant les sialyltransférases.

Enfin, l'ensemble de nos recherches ont fait l'objet de trois publications, les résultats présentés dans ce mémoire correspondant principalement aux publications 1 et 2.

Publications :

1. V. VANDAMME, H. CAZLARIS, N. LE MARER, V. LAUDET, C. LAGROU, A. VERBERT & P. DELANNOY.
Comparison of sialyl- and α -1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 cells transformed with ras oncogene: increased β -galactoside α -2,6-sialyltransferase. Biochimie (1992) 74, 89-100.
2. V. VANDAMME, A. PIERCE, A. VERBERT & P. DELANNOY.
Transcriptional induction of the β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblasts by dexamethasone. Eur. J. Biochem., (1993) 211, 135-140.
3. P. DELANNOY, H. PELCZAR, V. VANDAMME & A. VERBERT.
Sialyltransferases activities in FR3T3 cells transformed with ras

oncogene : decreased CMP-Neu5Ac: GalB1-3GalNAc α -2,3-sialyltransferase. Glycoconjugate J., (1993)10, 91-98.

En outre, les communications suivantes ont été présentées dans des réunions scientifiques.

Communication orale :

V. VANDAMME, A. PIERCE, A. VERBERT & P. DELANNOY.

Régulation par la dexaméthasone de la transcription de la β -galactoside α -2,6-sialyltransferase des fibroblastes de Rat.

XIV^{ème} Journées de la Chimie et Biochimie des Glucides, Villeneuve d'Ascq, 2-4 septembre 1992.

Communications par affiche :

1. V. VANDAMME, N. LE MARER, V. LAUDET, H. CAZLARIS, J. MONTREUIL & P. DELANNOY.

Comparaison des activités α -1,3-galactosyl- et α -2,3-sialyltransferasiques des cellules NIH3T3 transfectées par l'oncogène c-Ha-ras.

XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire), Villeneuve d'Ascq, 3-6 juillet 1990, Regard sur la Biochimie (1990) 3, 64.

2. N. LE MARER, V. VANDAMME, V. LAUDET, C. LAGROU, J. MONTREUIL & P. DELANNOY.

Increase of Gal(B1-4)GlcNAc(B1-R) : α -2,6-sialyltransferase activity in FR3T3 Rat fibroblasts transfected with c-Ha-ras human oncogene.

Conférences J. Monod, Aussois, 22-27 octobre 1990.

3. V. VANDAMME, N. LE MARER, V. LAUDET, H. CAZLARIS, A. VERBERT & P. DELANNOY.

Comparison of α -1,3-galactosyl- and sialyltransferases activities in NIH3T3 cells transformed with c-Ha-ras oncogene.

- XVIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire), Tours, 3-6 septembre 1991, Regard sur la Biochimie (1991) 5, 56.

- Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie, Villeneuve d'Ascq, 26-27 septembre 1991.
 - Congrès de Biochimie de Villepinte, 2-4 décembre 1991, Regard sur la Biochimie (1991) **6**, 91-92.

 - 4. V. VANDAMME, A. PIERCE, A. VERBERT & P. DELANNOY.
Régulation par la dexaméthasone de la transcription de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase des fibroblastes de Rat.
XIX^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire), Caen, 7-10 juillet 1992, Regard sur la Biochimie (1992) **3**, 68.

 - 5. H. PELCZAR, V. VANDAMME, A. VERBERT & P. DELANNOY.
Diminution de l'activité de la GalB1,3GalNAc α -2,3-sialyltransférase dans les fibroblastes de Rat FR3T3 transformés par l'oncogène ras.
XIV^{ème} Journées de la Chimie et Biochimie des Glucides, Villeneuve d'Ascq, 2-4 septembre 1992.

 - 6. P. DELANNOY, H. PELCZAR, V. VANDAMME & A. VERBERT.
Sialyltransferase activity in FR3T3 cells transformed with ras oncogene : decreased CMP-Neu5Ac:GalB1-3GalNAc α -2,3-sialyltransferase.
 - First Summerschool on glycobiology and glycochemistry, Lausanne, Switzerland, June 2nd-4th 1993.
 - XII Int. Symp. Glycoconjugates, Krakow, Poland, August 15-20th 1993.
-

ABRIDGED ENGLISH VERSION

According to their outer localization, cell surface carbohydrates are involved in a number of biological events such as differentiation, adhesion, recognition and mobility of the cells. Consequently, the change in the glycan structures occurring during physiological or pathological events, will be consequent on the behaviour of the cells. Analysis of the complex-type N-linked glycans isolated from cultured cells transformed with mitogenic agents shown changes in the molecular size due to an increased sialylation and an increased branching of the trimannosid core. These structural modifications were, also observed in N-glycans purified from tumor cells and associated with the tumorigenicity, the invasive capacity and the metastating potential of these malignant cells.

Since these changes were correlated with alterations in the activities of the some glycosyltransferases, more and more investigations were carried out in order to approach the understanding of the regulation pathway of these key enzymes.

It is in this purpose that the transfection of transforming oncogenes into mammalian cells was used. One of the oncogene the most readily used was the ras oncogene proceeding from the activation by point mutations of the normal cellular proto-oncogene.

The cellular ras genes code for small proteins with molecular weight of 21 kDa (eg. p21^{ras}) which are located at the inner-face of plasma membranes and possess GTP/GDP binding and GTPase activities. These proteins, belonging to the large family of the small G proteins, were shown to be involved in the transduction pathway of extracellular mitotic signals and to regulate the proliferation and the growth of some cells. P21^{ras} activity is down-regulated by GAPs (GTPase activating

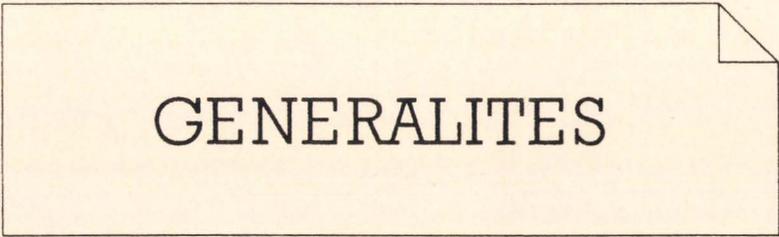
proteins) and up-regulated by GNRPs (guanine nucleotide-releasing proteins) but the mechanism of action and the role are not fully understood to date.

The transformation of cultured cells by transfection of ras oncogenes or by over-expression of the normal p21^{ras}, leads to the alteration of the cell surface carbohydrates. Analysis of the N-linked glycans isolated from ras-transformed cells revealed similar changes in the sialylation and in the branching of complex type glycans than these previously described for tumor cells and were, once again, correlated with the metastatic potential of ras-transformed cells. Indeed, since many of N-acetyllactosamine branches of complex type glycans carry terminal sialic acid residues, increased branching contributes to an overall increased sialic acid content and in the negative charge at the cell surface, correlated with the decreasing cellular adhesion and the induced cellular mobility.

According to these data, we analysed the alterations which could occur in the activities of the most important glycosyltransferases involved in the terminal glycosylation of the glycoproteins of two different rodent fibroblastic cell lines transformed by the human c-Ha-ras oncogene. In both cases we were able to demonstrate an increase of the sialylation of the N-linked carbohydrates. This sialylation of the N-linked glycans is the result of three specific sialyltransferases : Gal β 1-3/4GlcNAc: α 2,3-ST (I), Gal β 1-4GlcNAc: α 2,3-ST (II) and Gal β 1-4GlcNAc: α 2,6-ST. Since this last enzyme was shown to be controlled by several liver-enriched transcriptional factors and by dexamethasone via the glucocorticoid receptor pathway in rat liver, we took a particular interest in the effect of glucocorticoid on the expression of this enzyme in our model. Although the α -2,6-sialyltransferase is cloned, little is known to date about its

regulation by the glucocorticoid receptors pathway. In order to bring some informations on this aspect of the regulation of the expression of the α -2,6-sialyltransferase gene, we analysed the concomitant effect of the induction of the α -2,6-sialyltransferase expression by both, ras oncogene and dexamethasone.

Our work was the subject of three papers, and the results presented in this memory correspond mainly to the references 1 and 2.



GENERALITES

I - LES ONCOGENES

"Cancer is one of the great challenges that the tomorrow's medicines have to take up. In the heart of the struggle, Oncogenes."

(Auteur inconnu)

Depuis ces vingt dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes qui gouvernent la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires, mécanismes qui lorsqu'ils sont déréglés induisent une croissance anarchique des cellules caractérisant leur transformation maligne.

En particulier, la découverte et l'étude des oncogènes viraux et des proto-oncogènes cellulaires ont été d'un grand secours dans l'étude de ces mécanismes, ainsi que dans la détermination des étapes séquentielles du développement des cancers.

I - RETROVIRUS ONCOGENES ET PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES.

L'hypothèse selon laquelle le développement des cancers résultait de modifications somatiques du matériel génétique, avait déjà été avancée dès le début du siècle (Bovari, 1914). Mais ce sont principalement les travaux de Peyton Rous en 1911 qui sont à la base de la découverte des rétrovirus oncogènes. En effet, ayant injecté à des Poulets un filtrat cellulaire préparé à partir d'une tumeur apparue spontanément chez une Poule, Rous constata qu'ils développaient des tumeurs extrêmement malignes appelées sarcomes. Il démontra par la suite que l'agent causal de la tumeur présent dans ce filtrat, pouvait se propager

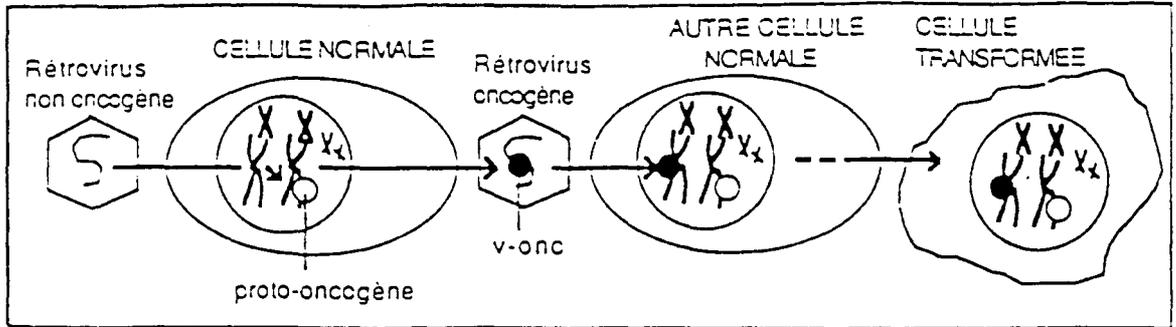


Figure 1 : Transduction d'un proto-oncogène par un rétrovirus (Stéhelin, 1988) (voir texte).

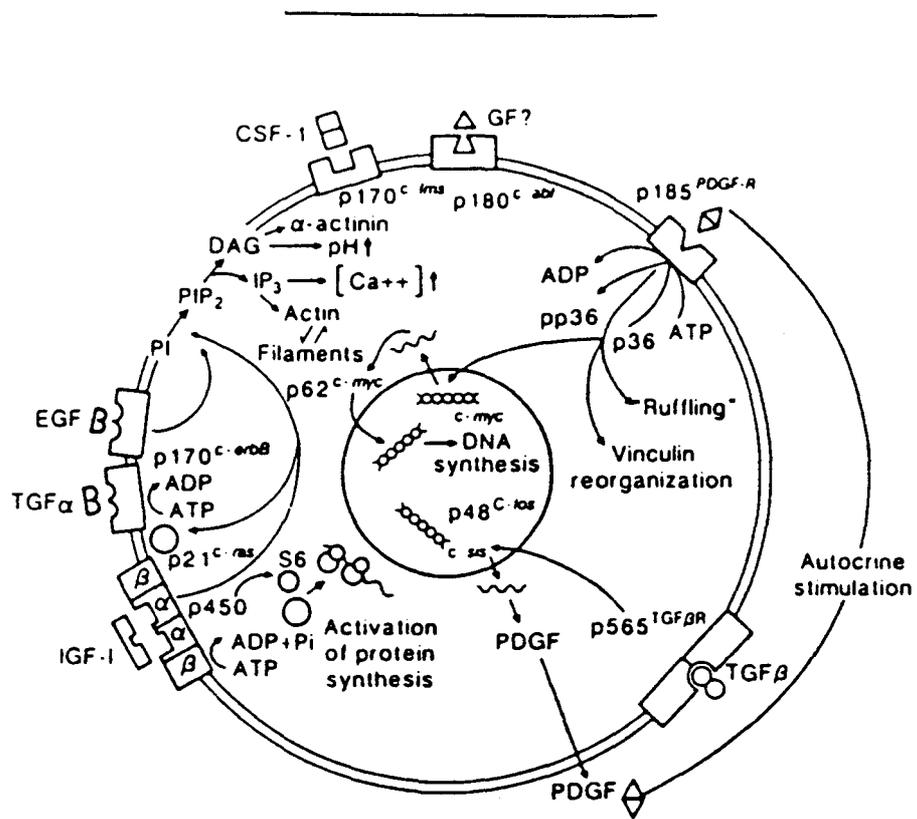


Figure 2 : La "cascade" des oncogènes (Goustin et al., 1986).

par passages successifs chez ces animaux. Cet agent causal, appelé depuis virus du sarcome de Rous (Rous sarcoma virus : RSV) ou encore virus du sarcome aviaire (avian sarcoma virus : ASV) fût ensuite identifié comme l'un des membres du groupe des virus tumorigènes à ARN, les rétrovirus oncogènes.

Il a fallu ensuite attendre les années 1976-1980 pour que soit découverte par D. Stéhelin dans le laboratoire de J.M. Bishop, la présence dans ce virus d'un gène responsable de l'induction des tumeurs. En utilisant des mutants du RSV ayant perdu la capacité d'induire des sarcomes chez le Poulet, il identifia une petite séquence génomique responsable de la capacité de ce virus cancérigène à induire des tumeurs (Stéhelin et al., 1976a). Ce "gène du cancer" ou oncogène viral utilisé ensuite comme sonde, permit de mettre en évidence dans le génome d'animaux sains, la présence d'une séquence chromosomique analogue à l'oncogène viral qu'il appela : proto-oncogène cellulaire (Stéhelin et al., 1976b). En déduisant que les oncogènes viraux cancérigènes dérivait en fait des proto-oncogènes cellulaires normaux, D. Stéhelin établit alors la "théorie de la genèse des virus oncogènes" (Fig.1, p.19). Ainsi, très tôt au cours de l'évolution, un virus ancestral non cancérigène aurait, lors d'une infection, emporté une petite séquence chromosomique de la cellule hôte, cette phase constituant la "transduction" du proto-oncogène. Ce gène devenu partie intégrante du génome viral a pu au cours de l'évolution subir une ou plusieurs mutations rendant le virus oncogénique. Lorsque des cellules sont infectées par ce virus devenu oncogène, elles se voient alors forcées d'exprimer le gène muté, cette expression conduisant à une prolifération anormale des cellules (Stéhelin, 1988).

TABLEAU I :

LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES PRODUITS DES PROTO-ONCOGENES.
(d'après Stéhelin, 1988)

Localisation des produits	Proto-oncogène	Caractéristiques des produits (identité ou homologie, activité)
Extracellulaire	<i>sis</i>	Homologie avec un facteur de croissance : Chaîne β du PDGF
Transmembranaire	<i>erbB-1</i>	Homologie avec un récepteur : Récepteur de l'EGF
	<i>fms</i>	Récepteur du CSF-1
	<i>ros</i>	Récepteur de l'insuline
Membranaire (face interne de la membrane plasmique)	<i>src</i>	Homologie avec un système transducteur : Activité tyrosine-kinasique
	<i>yes</i>	Activité tyrosine-kinasique
	<i>fes/fps</i>	Activité tyrosine-kinasique
	<i>ras</i>	Activité GTPasique
Cytoplasmique	<i>mil/raf</i>	Activité sérine/thréonine kinasique
Nucléaire	<i>myc</i>	Homologie avec les facteurs de transcription; fixation sur : l'ADN
	<i>myb</i>	myb-Box
	<i>fos</i>	site TRE
	<i>jun</i>	site TRE
	<i>ets</i>	site PEA-3
	<i>rel</i>	l'ADN
	<i>erb-A</i>	Homologie avec le récepteur des hormones thyroïdiennes : liaison de la thyroxine

II - ONCOGENES ET DEVELOPPEMENT CELLULAIRE.

Depuis la découverte de ce premier proto-oncogène (c-src; dérivé de sarcome), une cinquantaine de proto-oncogènes cellulaires ont été identifiés à ce jour. S'agissant tous de gènes normaux présents dans l'ADN de cellules normales, ils sont exprimés au cours des processus normaux du développement cellulaire. Toutefois, l'analyse de nombreuses tumeurs induites ou non par des rétrovirus, a permis de corrélérer étroitement les modifications de ces proto-oncogènes ou encore la dérégulation de leur expression à la transformation maligne, ceci suggérant que la fonction normale de ces proto-oncogènes consiste à participer à la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire.

En fait, les proto-oncogènes cellulaires codent pour des protéines intervenant dans le contrôle de l'une des étapes de la mitose. Ainsi, une classification des proto-oncogènes cellulaires a pu être établie en fonction du niveau d'intervention de leur produit selon leur localisation subcellulaire (Tab.I, p.21). On a pu constater que les produits de ces gènes pouvaient aussi bien être localisés à l'extérieur de la cellule tel que le produit du gène c-sis ou dans différents compartiments cellulaires : membrane plasmique, cytoplasme et noyau. A partir de cette classification, il a pu être établi par la suite un schéma d'action des proto-oncogènes cellulaires, appelé "la cascade des oncogènes" (Fig.2, p.19) qui se calque sur le schéma d'action des protéines impliquées dans la transduction des signaux mitotiques. Ces protéines qui régulent la croissance cellulaire sont soit :

- **des facteurs de croissance** qui, localisés à l'extérieur de la cellule, amènent à celle-ci un message mitotique,
- **des récepteurs de facteur de croissance** qui, activés par la fixation de leur ligand, vont transduire le signal mitogène à travers la membrane plasmique,

- **des molécules transductrices** localisées à la face interne de la membrane et qui transmettent le signal mitogène depuis le récepteur en contrôlant la production des "seconds messagers",
- enfin, **des molécules, qui localisées dans le noyau** vont réguler directement ou en amont, l'expression de gènes cibles.

Ainsi, selon le schéma de la "cascade des oncogènes", les produits des proto-oncogènes cellulaires peuvent être identifiés fonctionnellement à chacune de ces molécules (Tab.I, p.21):

1 - **Oncogènes facteurs de croissance** : le produit du gène c-sis, homologue de l'oncogène v-sis du virus sarcomateux du singe (SSV), a été identifié à la chaîne β du PDGF. Les cellules transformées par v-sis produisent un nouveau facteur qui, excrété, va se lier au récepteur du PDGF et l'activer constitutivement induisant ainsi un signal de croissance auto-entretenu.

2 - **Oncogènes récepteurs de facteurs de croissance** : le produit du gène c-erbB, homologue cellulaire de l'oncogène v-erbB du virus du sarcome de l'érythroblastose aviaire (AEV), localisé dans la membrane plasmique de nombreuses cellules, a été identifié comme étant fortement homologue structuralement et fonctionnellement au récepteur de l'EGF. Tout comme ce dernier, la protéine c-erbB possède une activité tyrosine kinasique et est capable de s'autophosphoryler.

Le proto-oncogène c-fms code pour une protéine mise en évidence dans la membrane plasmique des macrophages, capable de fixer le CSF1 (colony stimulating factor 1).

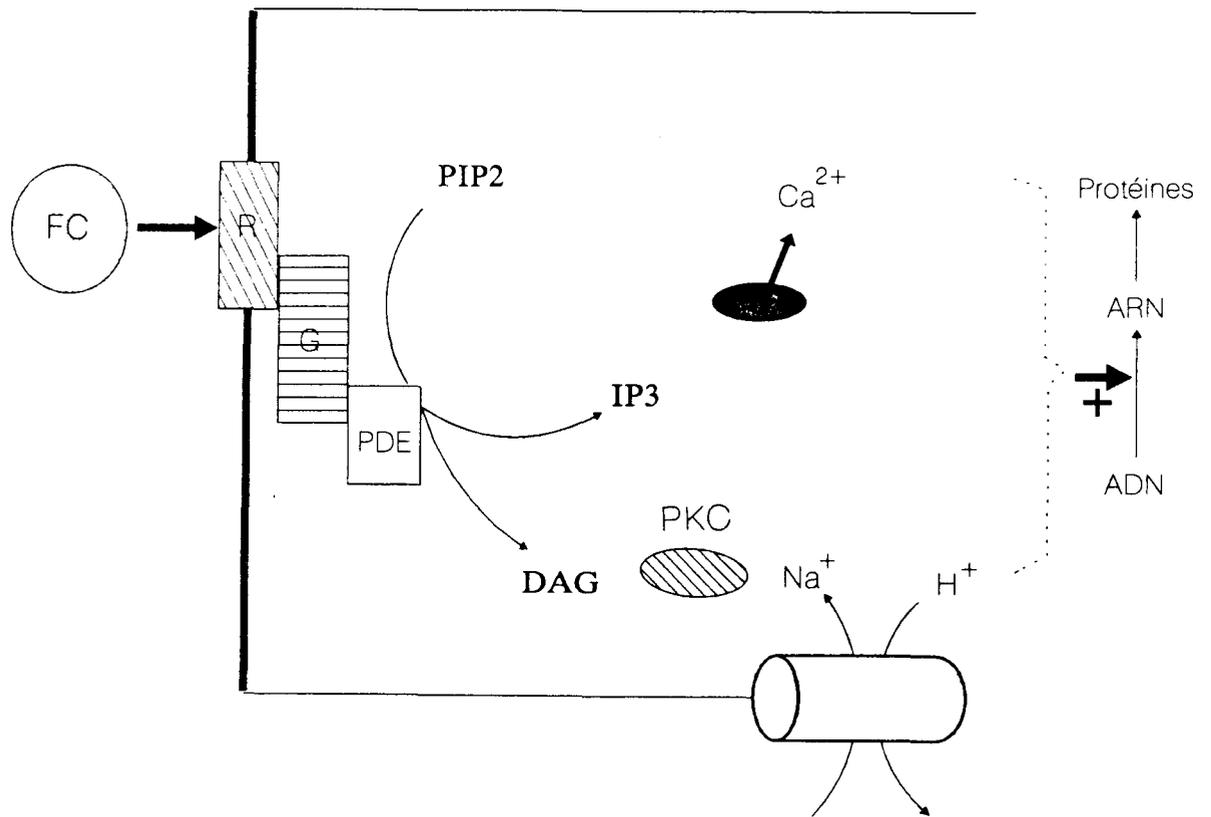


Figure 3 : Voie de transduction d'un signal par l'intermédiaire du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) (Morello & Babinet, 1989) (voir texte).

FC : facteur de croissance; R : récepteur; G : protéine G; IP₃ : inositol triphosphate; PIP₂ : phosphatidylinositol biphosphate; PKC : phosphokinase C.

3 - Oncogènes et transmission du signal : il existe plusieurs mécanismes permettant la transmission du signal mitotique depuis le récepteur jusque dans le cytoplasme de la cellule. Ces mécanismes mettent en jeu des transducteurs membranaires qui contrôlent la production des "seconds messagers". Ces derniers vont ensuite transmettre le message selon deux mécanismes différents :

a) La phosphorylation qui permet de moduler l'activité de protéines enzymatiques de manière rapide et réversible. Ainsi, les produits des proto-oncogènes c-src et c-fes/fps possèdent une activité tyrosine-kinasique.

b) La stimulation du métabolisme des phosphatidylinositols : les protéines G, transmettent des messages extracellulaires à des systèmes effecteurs tels que l'adénylate cyclase en stimulant la phosphodiesterase (PDE). Celle-ci hydrolyse le phosphatidylinositol (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) qui serviront de "seconds messagers" (Fig.3, p.24). L' IP_3 a pour effet de mobiliser le calcium intracellulaire alors que le DAG, par l'intermédiaire de la phosphokinase C (PKC) qui active la pompe Na^+/H^+ , augmente le pH intracellulaire.

Les produits des proto-oncogènes c-ras qui présentent une certaine homologie structurale et fonctionnelle avec les protéines G, semblent, à l'instar de ces molécules, intervenir dans la transduction des signaux mitotiques. Ainsi, dans le cas de la Levure Saccharomyces cerevisiae, elles activent directement l'adénylate cyclase alors qu'il semblerait qu'elles soient capables dans quelques espèces de cellules de mammifères, d'intervenir dans le métabolisme des phosphatidylinositols.

4 - Oncogènes et facteurs de transcription : la régulation de l'expression des gènes cibles suite à la transduction de signaux mitotiques, fait, entre autre, intervenir des facteurs de transcription.

TABLEAU II :

ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES (Stéhelin, 1988).

* L'activation peut s'opérer par :

- modification de la nature du produit

- augmentation de la dose du produit

(ces deux processus peuvent coexister pour un effet cumulatif)

* On distingue des activations par :

Mutations : ras
 erbB-2/HER/neu

Translocations : c-myc
 abl

Amplifications : c-myc, N-myc
 erbB-2/HER/neu
 erbB-1/HER

myb

ras

abl

Accumulation d'ARN : c-myc (mécanisme inconnu)

L'exemple type de l'intervention des produits des proto-oncogènes cellulaires dans le contrôle de la transcription de certains gènes est donné par les gènes c-jun et c-fos (homologue cellulaire de v-fos du virus de l'ostéosarcome murin FBJ). Leurs produits, sous la forme d'un complexe dimérique (c-Fos/c-Jun ou c-Jun/c-Jun) appelé complexe AP-1 (activating protein 1), vont, suite à une stimulation des cellules par le sérum, par les esters de phorbols, par le TNF- α ou par l'EGF, se fixer spécifiquement sur un site TRE (TPA-response element), en amont de la séquence codante d'un gène cible.

III - ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES.

Compte tenu de la nature des proto-oncogènes actuellement identifiés, il est concevable que tout gène codant pour un facteur de croissance, un récepteur de facteur de croissance, un second messager ou encore pour un facteur de transcription, puisse être un proto-oncogène.

Ainsi, toute modification de ces gènes susceptible de les activer en oncogènes transformant pourra conduire à une dérégulation des mécanismes de transduction des signaux mitotiques, troublant ainsi le développement "harmonieux" de la cellule avec pour conséquence, une croissance anarchique caractéristique de sa transformation maligne.

L'activation des proto-oncogènes cellulaires peut se manifester par des changements quantitatifs et/ou qualitatifs de leur expression.

Comme le montre le tableau II (p.26), on pourra distinguer :

1 - Le processus qualitatif d'activation.

Dans ce cas, une (ou plusieurs) modification(s) de la séquence codante du proto-oncogène cellulaire conduira à la synthèse d'une

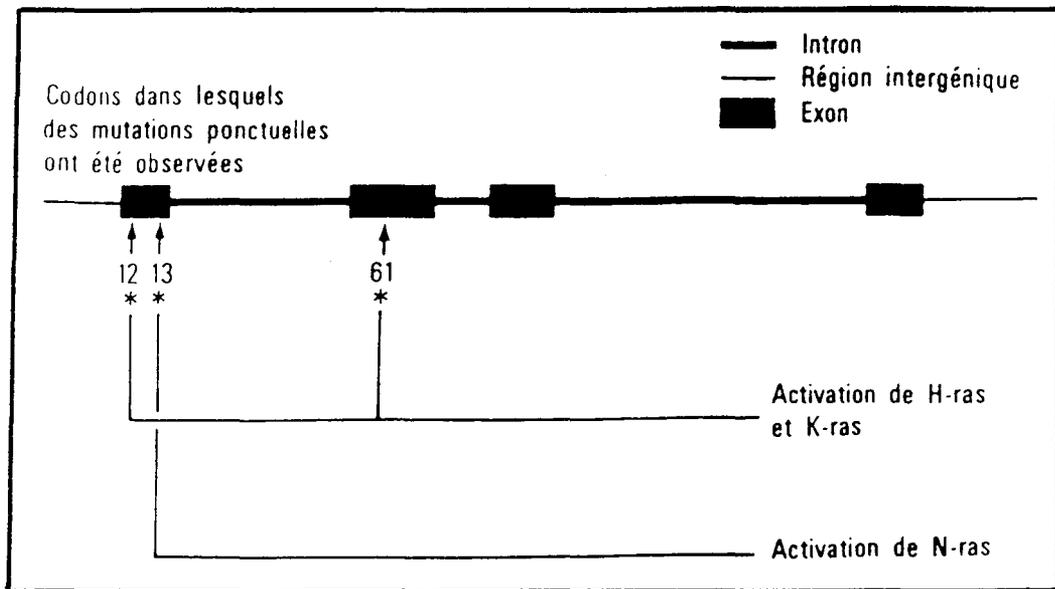


Figure 4 : Mutations ponctuelles de l'oncogène *c-ras* en des sites particuliers (revue de Loucheux-Lefebvre, 1987).

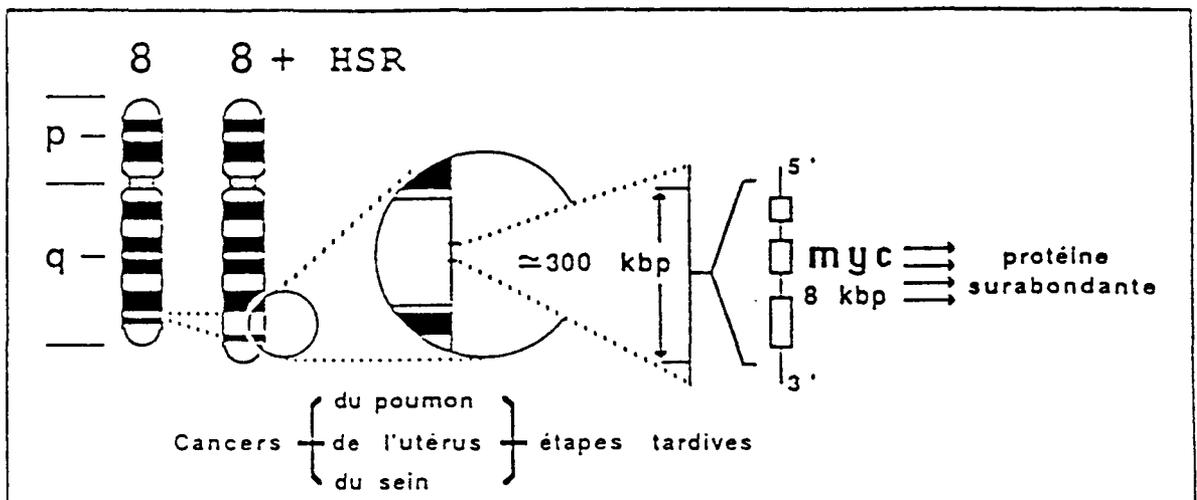


Figure 5 : Amplification d'un proto-oncogène (exemple de *c-myc*).

Une partie du chromosome se trouve amplifiée, entraînant l'accumulation surabondante des produits des gènes correspondants (incluant l'oncogène). HSR: "homogeneous staining region" (Stéhelin, 1988).

protéine mutée dans sa structure et présentant de ce fait une activité modifiée.

Cette activation peut être provoquée par des mutations ponctuelles, l'exemple le plus connu étant celui des proto-oncogènes c-ras qui sont activés par des mutations ponctuelles dans les codons 12, 13 ou 61 (Fig.4, p.28) du gène codant pour la protéine p21^{ras}.

2 - Le processus quantitatif d'activation.

L'activation d'un proto-oncogène cellulaire en oncogène transformant peut également être due à une sur-expression du gène. La transformation résulte alors d'une augmentation de la quantité de protéine exprimée dans la cellule, se traduisant par un signal mitotique anormalement élevé.

La sur-expression d'un proto-oncogène cellulaire peut-être provoquée par translocation chromosomique. Citons comme exemple les cellules isolées du lymphome de Burkitt qui possèdent toutes la même modification chromosomique. Un fragment du chromosome 8 contenant le proto-oncogène c-myc a été échangé par translocation réciproque avec un fragment du chromosome 14 (ou 2 ou 22), à proximité des gènes codant pour les immunoglobulines. L'expression de ce proto-oncogène est alors fortement activée par cette cassure chromosomique.

D'autre part, l'activation peut être provoquée par amplification génique. Certains petits segments chromosomiques contenant un proto-oncogène tel que c-myc, c-erbB-2, c-ras ou c-myb peuvent être amplifiés, formant une région HSR (homogeneous staining region) ou ECR (expanded chromosome region). Lors de la réplication de l'ADN, ce segment, appelé amplicon, est copié de multiples fois au lieu d'une seule fois et il en résulte une production anormalement élevée du produit de l'oncogène concerné (Fig.5, p.28).

TABLEAU III :

QUELQUES PROTO-ONCOGENES TRANSDUITS CHEZ DES SOURIS TRANSGENIQUES.

Oncogènes	Séquences régulatrices	Références
<i>c-myc</i>	MMTV (mouse mammary tumor virus) WAP (whey acidic protein) E μ (enhancer du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines)	Leder <u>et al.</u> , 1986 Schonenberger <u>et al.</u> , 1988 Adams <u>et al.</u> , 1985
<i>c-ras</i>	MMTV WAP	Sinn <u>et al.</u> , 1987 Andres <u>et al.</u> , 1987
<i>c-neu</i>	MMTV	Muller <u>et al.</u> , 1988
<i>int-1</i>	MMTV	Nusse R., 1988
<i>c-fos</i>	métallothionéine	Rüther <u>et al.</u> , 1988

Enfin, la sur-expression d'un proto-oncogène cellulaire peut faire suite à une accumulation d'ARN. Ce processus d'activation, qui n'a été observé que pour c-myc, résulte d'un mécanisme encore inconnu. Toutefois, il est supposé actuellement qu'une mutation au niveau du promoteur du proto-oncogène pourrait être responsable de cette dérégulation de la transcription, conduisant à une accumulation de la protéine en conséquence d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm.

IV - THEORIE UNIFICATRICE DU CANCER.

Nombre de travaux ont été consacrés ces dernières années aux relations pouvant exister entre les oncogènes, leurs différents processus d'activation et la transformation maligne in vitro ou le phénomène de cancérisation in vivo.

Ainsi, depuis la mise en évidence de l'activation de proto-oncogènes cellulaires dans de nombreux cancers, il a été avancé une théorie unificatrice de la genèse des cancers selon laquelle, le développement des cancers serait induit par une modification accidentelle de certains gènes cellulaires normaux, en l'occurrence les proto-oncogènes. Ces modifications accidentelles peuvent se faire suite à une infection par un virus oncogène ou en conséquence de mutations spontanées ou induites par des agents cancérigènes chimiques ou physiques (Stéhelin, 1988).

Ainsi, afin de déterminer si, in vivo, l'expression d'oncogènes activés est la cause directe du phénomène de cancérisation ou plutôt un facteur le favorisant, des études ont été effectuées récemment grâce à l'utilisation d'animaux transgéniques ayant intégré dans leur génome différents oncogènes cellulaires ou viraux (Babinet & Morello, 1986; Compere et al., 1988) (Tab.III, p.30).

L'intérêt de ces études, en dehors des informations qu'elles fournissent sur le pouvoir transformant des oncogènes, est de permettre d'analyser les conséquences physiologiques de l'expression anormale de ces gènes qui peut être dirigée dans un ou plusieurs tissus spécifiques et/ou modulée durant le développement, et ceci grâce à l'association d'un proto-oncogène à des séquences régulatrices appropriées et éventuellement inductibles, promoteurs ou enhanceurs hétérologues, viraux ou cellulaires.

Dans tous les cas étudiés, l'intégration d'un tel transgène dans le génome n'induisait pas de manière systématique la cancérisation, mais augmentait la "probabilité" d'apparition de tumeurs dans les tissus où s'exprimaient spécifiquement la séquence hétérologue contrôlant le proto-oncogène. Ainsi, lorsqu'un proto-oncogène tel que c-myc ou c-ras était associé au enhanceur LTR (long terminal repeat) du virus MMTV (virus de la tumeur mammaire de la Souris) inductible par les glucocorticoïdes, il a pu être observé une sensible augmentation de la fréquence d'apparition de tumeurs de la glande mammaire en cas de grossesses répétées (Stewart et al., 1985, Leder et al., 1986).

V - CANCEROGENESE MULTI-ETAPES.

Puisque l'expression d'un oncogène activé dans un organisme n'est qu'un facteur favorisant la tumorigenèse alors que bon nombre de ces gènes activés ont justement été caractérisés après avoir été isolés de cancers spontanés ou induits, il semblerait donc que le processus tumoral soit plus complexe et qu'il nécessite plusieurs étapes successives s'ajoutant à l'activation des proto-oncogènes cellulaires.

A cet égard, la coopération d'oncogènes a été étudiée à la fois in vivo et in vitro. Afin d'étudier l'effet de l'activation de deux

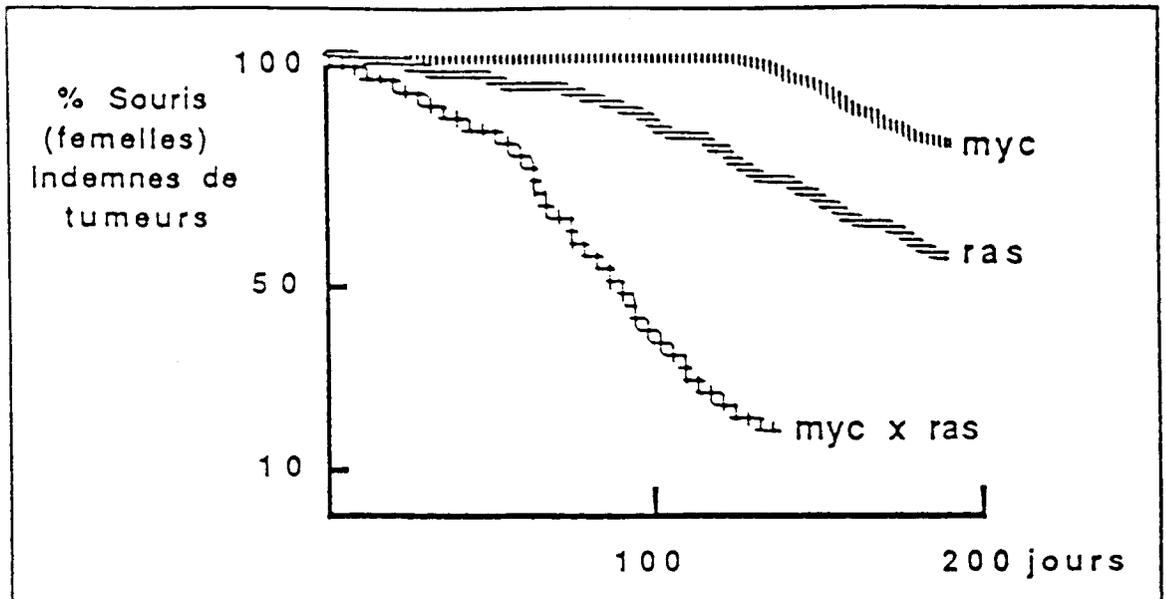
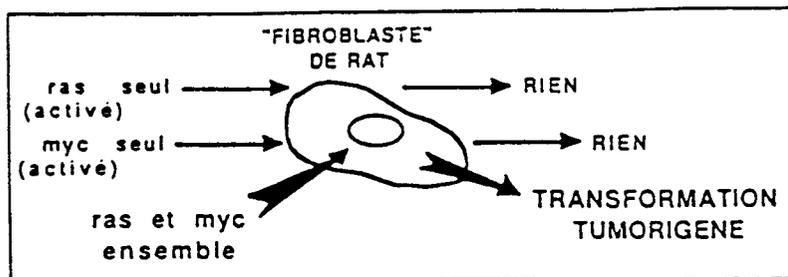


Figure 6 : Coopération entre les oncogènes ras et myc.

(A) : Tumeurs mammaires chez des Souris femelles transgéniques contenant MMTV-myc et ras.



(B) : Transfections in vitro.

proto-oncogènes sur l'incidence de l'apparition de tumeurs, une lignée de Souris transgéniques ayant intégré le transgène MMTV-LTR-c-myc fut croisée avec une lignée ayant intégré le construit MMTV-LTR-c-ras. Les lignées de Souris filles obtenues ayant dans leur génome les deux gènes activés, développaient des tumeurs mammaires avec une incidence à la fois plus précoce et plus importante que les lignées parentales (Fig.6A, p.33) (Sinn et al., 1987), indiquant la possibilité d'une coopération entre les deux oncogènes activés dans le phénomène de cancérisation. Il est donc possible de conclure de ces différentes études que les oncogènes ont des capacités transformantes qui varient en fonction des tissus dans lesquels ils sont exprimés, qu'ils prédisposent mais ne sont pas suffisants à la formation et au développement des tumeurs, et enfin qu'ils peuvent coopérer, leur interaction aboutissant à une accélération de la formation de la tumeur (Morello & Babinet, 1989).

L'effet coopératif de l'expression d'oncogènes activés a également été étudié dans des lignées de cellules établies en culture. Il a pu être montré qu'après transfection des deux mêmes oncogènes myc et ras dans des fibroblastes embryonnaires de Rat, les cellules ne présentaient aucune modification dans leur croissance, alors que la co-transfection simultanée de ces deux oncogènes transformait ces fibroblastes qui se mettaient alors à croître de façon anarchique (Land et al., 1983) (Fig.6B, p.33). Il semble donc, depuis la mise en évidence de la coopérativité entre oncogènes activés, que plusieurs activations soient nécessaires au sein d'une cellule pour induire sa transformation maligne.

En conclusion, le processus de transformation maligne est un processus lent qui nécessite plusieurs étapes successives d'activation de proto-oncogènes. Ainsi, une cellule normale devient dans un premier temps initiée, puis tumorale pour enfin devenir maligne et métastatique (Fig.7, p.35).

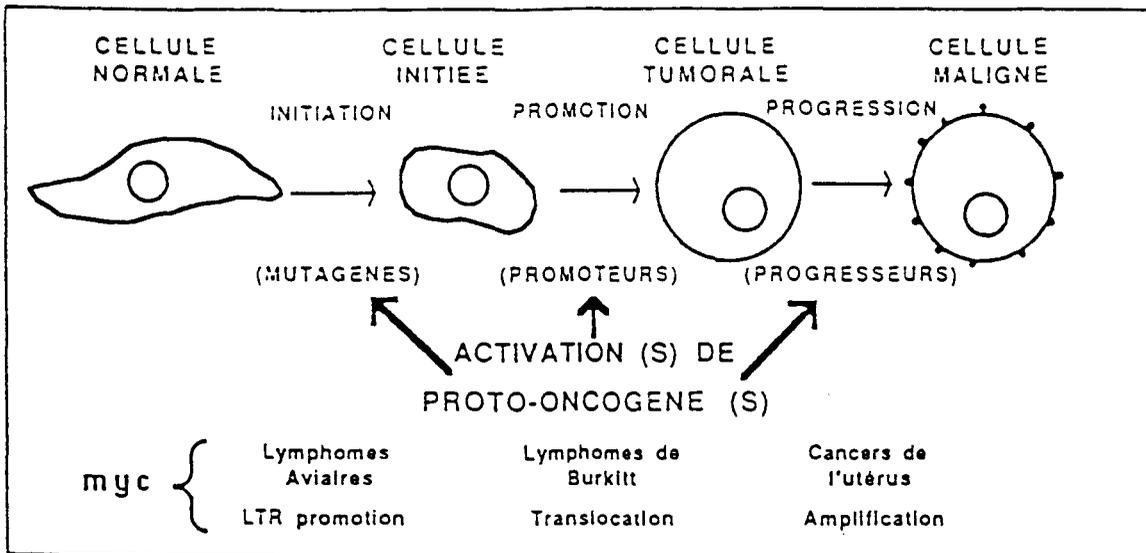


Figure 7 : Schématisation du processus de tumorigenèse multi-étapes
(exemple de l'implication de c-myc) (Stéhelin, 1988).

VI - LES ANTI-ONCOGENES.

La notion d'oncogènes telle qu'elle a été définie dans les paragraphes précédents sous-tend intrinsèquement la notion d'anti-oncogènes. En effet, puisqu'il existe effectivement des gènes dont la forme mutée ou sur-exprimée active la croissance cellulaire et favorise la cancérisation, il était concevable de penser qu'il puisse également exister des gènes ayant pour rôle de ralentir la croissance voire d'inhiber la transformation maligne. Ainsi, tout gène dont le produit pourrait rétablir une fonction cellulaire dont la dérégulation induit ou participe à la transformation cellulaire, peut être considéré comme un anti-oncogène.

Le gène Rb, localisé en position 14 sur le bras court du chromosome 13 (14q13) est un exemple typique de gène suppresseur de tumeur puisque son absence sur l'un des allèles chromosomiques d'un embryon induit une prédisposition au rétinoblastome (cancer de la rétine chez l'Enfant) (Schweisguth, 1979). En outre, ce gène s'apparente à un anti-oncogène puisque dans tous les rétinoblastomes observés, il a été caractérisé une amplification de l'expression de N-myc (Lee et al., 1984).

Un autre exemple de mise en évidence d'un anti-oncogène peut être donné par les travaux du groupe de M. Noda (Kitayama et al., 1989). En cherchant un ADNc dont la surexpression serait capable de réverter le phénotype malin de fibroblastes murins transformés par l'oncogène ras, ces auteurs ont pu identifier un gène (appelé krev-1) dont le produit (Krev-1 ou rap1A ou smgp21) présente près de 50 % d'homologie avec la protéine p21 de c-ras et est capable d'inhiber l'effet de la p21^{ras} modifiée en entrant efficacement en compétition avec celle-ci dans ses interactions avec ses effecteurs.

Tableau IV : Liste (non exhaustive) des proto-oncogènes amplifiés dans diverses affections néoplasiques (d'après Szepetowski et al., 1991).

Proto-oncogène	EGFR	c-erbB2	bcl1 ncl int2	c-myc	L-myc	N-myc	Ha-ras	K1-ras	N-ras
Type tumoral									
Adénocarcinomes									
Adénocarcinome mammaire	■	□	□	□			■		
Adénocarcinome ovarien		□		□				■	
Adénocarcinome colorectal		□		□					
Adénocarcinome gastrique		□		□					
Carcinomes divers									
Carcinome du col utérin				□					
Carcinome oesophagien	■		□	□					
Carc. mapiighien ORL			□	□		■		■	■
Carcinome vésical	■	■	■					■	
Tumeurs d'origine neuro-ectodermiques									
Neuroblastome						□			
Carcinome du poumon				□	□	□			
Rétinoblastome	■					■			
Mélanome			■						
Leucémies									
Leucémie aigüe myéloïde				■					
Leucé myéi chronique				■					

□	Amplifié dans un nombre significatif de tumeurs	■	Amplification observée dans quelques cas	■	Faible niveau d'amplification	□	Amplification jamais observée ou non connue
---	-------------------------------------------------	---	------------------------------------------	---	-------------------------------	---	---------------------------------------------

Enfin, dans le cas de certains cancers du colon, il a été décrit à la fois une activation du proto-oncogène ras et une inactivation des gènes suppresseurs p53 et dcc (Baker et al., 1990).

VII - ONCOGENES ET CANCERS HUMAINS.

Grâce aux progrès effectués ces dernières années dans l'étude génétique et moléculaire de l'induction et du développement des tumeurs, on a pu mettre en évidence la présence de nombre de proto-oncogènes qui sont activés dans divers cancers humains. Ces travaux ont permis d'une part, d'établir une liste des corrélations existant entre le mode d'activation de ces gènes (ou la fréquence de rencontre d'une famille de proto-oncogènes) et le type de tumeurs, mais également de mettre au point des tests diagnostiques utilisant les produits de ces oncogènes comme marqueurs de cancérisation.

Ainsi, par exemple, en se reportant à la liste des proto-oncogènes activés par amplification dans différents types de tumeur, donnée dans le tableau IV (p.37), la détermination du niveau d'amplification de N-myc pourrait être un bon marqueur permettant de diagnostiquer les neuroblastomes ou de suivre les éventuels progrès thérapeutiques puisque, même si l'amplification de N-myc n'est pas spécifique de ces neuroblastomes, elle est cependant limitée à un petit nombre de types tumoraux. De même, l'amplification de L-myc n'étant décrite que dans les carcinomes à petites cellules du poumon, elle sera un bon marqueur de ces types de tumeurs. D'autres exemples peuvent être donnés par les proto-oncogènes Ha-ras et N-ras qui ne sont amplifiés respectivement que dans les adénocarcinomes mammaires et les carcinomes malpighiens ORL. Par contre, l'amplification du proto-oncogène c-myc ayant

été décrite dans de très nombreuses tumeurs, elle ne pourra donc pas être utilisée comme marqueur spécifique. Ceci nous permet, ici, de souligner l'importance de la mise en place de tests diagnostiques précoces ou susceptibles de mettre en évidence l'évolution de la tumeur et l'efficacité du traitement thérapeutique. A cet égard, l'étude des gènes concernés ou dont l'expression est modifiée par certains oncogènes pourrait être d'un apport considérable pour compléter le choix des tests actuellement utilisés. A cette fin, l'étude des proto-oncogènes ras, gènes activés dans nombre de cancers humains, apparaît être de première importance.

Tableau V : Origine des différents proto-oncogènes ras et localisation génomique sur les chromosomes humains.

Deux pseudogènes non fonctionnels ont été identifiés chez l'Homme et le Rat (revue générale par Stéhelin, 1988).

Proto-oncogène	localisation	Cellules cancéreuses humaines d'origine	Oncogène viral isolé de :
Ha-ras-1	11p15	EJ: carcinome de la vessie	virus du sarcome murin de Harvey
K-ras-2	12p11-p12	carcinome pulmonaire	virus du sarcome de Rat de Kirsten
N-ras	1p11-p13	SK-N-SH: neuroblastome	-----
pseudogènes humains			
H-ras-2	chr. X		
K-ras-1	6p12-p23		

II - LES ONCOGENES RAS

Les proto-oncogènes de la famille ras, dont le nom dérive de "rat sarcoma", présentent un fort degré de conservation au cours de l'évolution puisqu'ils ont été identifiés dans l'ensemble des eucaryotes. Chez les mammifères, ils codent pour de petites protéines G de 21 kDa ($p21^{ras}$) qui, localisées à la face interne des membranes plasmiques, semblent participer à la transduction des signaux mitotiques en fixant et en hydrolysant le GTP. Il a été démontré que trois proto-oncogènes de cette famille, qui ont été caractérisés dans le génome humain et qui s'expriment normalement (mais en faible quantité) dans la plupart de nos cellules, sont activés en oncogènes dans 15 à 20% des tumeurs humaines. Ces chiffres expliquent l'intérêt qui est porté actuellement à l'étude de cette famille de gènes. Ainsi, la détermination de leurs propriétés biochimiques pourrait éventuellement permettre de comprendre les mécanismes par lesquels ces gènes, une fois activés en oncogènes, sont capables de dérégler la croissance harmonieuse des cellules et d'induire leur transformation maligne.

I - STRUCTURE DES PROTEINES RAS.

1 - Structure primaire des $p21^{ras}$.

Les proto-oncogènes ras sont présents dans le génome des mammifères sous la forme de trois gènes cellulaires : c-Ha-ras, c-Ki-ras et c-N-ras, qui ont été initialement découverts et isolés sous leur forme activée oncogénique à partir de tumeurs humaines (Tab.V, p.40). Les séquences codantes de ces gènes, fortement conservées et semblant dériver d'un gène ancestral commun, sont distribuées sous formes de 4 exons, sauf dans le cas de Ki-ras 2 qui présente la particularité

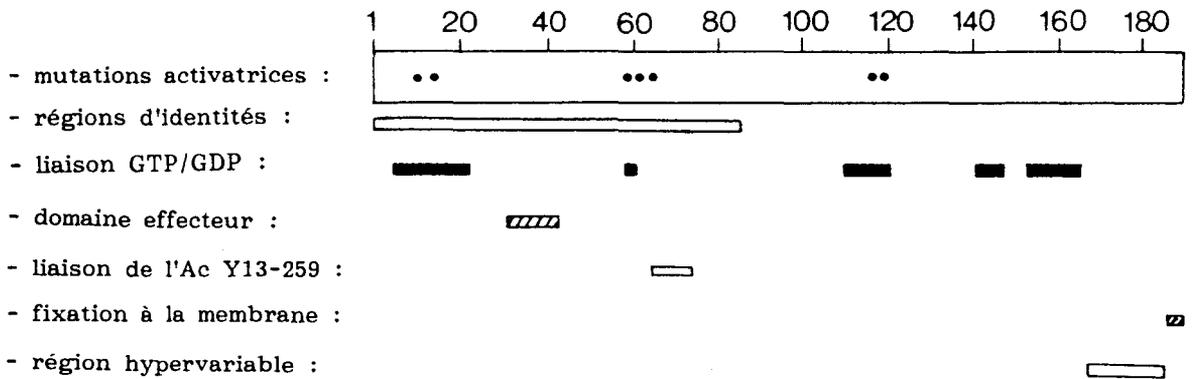


Figure 8 : Représentation schématique des domaines structuraux et fonctionnels des protéines p21^{ras} des mammifères (d'après Barbacid, 1987).

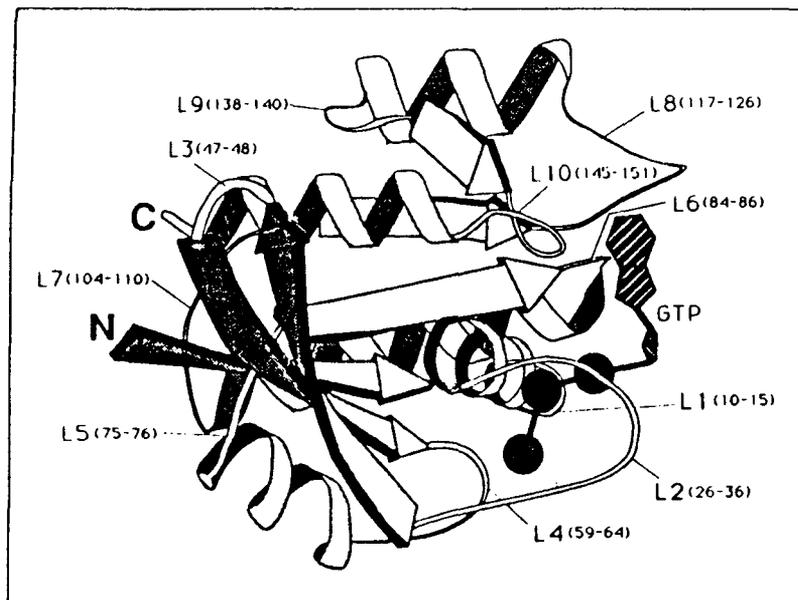


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la p21^{ras} humaine.

Les 10 boucles reliant les 5 hélices α et les 6 feuillets β , sont numérotées de L1 à L10. Le GTP est représenté lié à la protéine p21^{ras} (Wittinghofer & Pai, 1991).

d'avoir 2 exons 4 alternatifs (IVA et IVB) permettant la synthèse de deux protéines de 188 et 189 acides aminés qui diffèrent dans leur partie C-terminale (Mc Grath et al., 1983; Shimizu et al., 1983; Capon et al., 1983).

La comparaison des séquences en acides aminés des protéines p21 traduites de ces trois gènes ras, a permis de définir trois types de régions dans la structure primaire de ces protéines (Fig.8, p.42) :

- deux régions d'identité composées des 86 premiers résidus d'acides aminés et des 4 derniers résidus formant la CAAX Box,
- une région d'homologie : fortement conservée (86% d'identité) située entre les acides aminés 87 à 165,
- et une région hypervariable.

2 - Structure tridimensionnelle et organisation en domaines.

Des études cristallographiques ont permis de déterminer la structure secondaire des p21^{ras} (Fig.9, p.42). Celles-ci sont organisées en 5 hélices α , un feuillet β central à 6 brins dont 5 sont parallèles et 1 anti-parallèle et 10 boucles reliant ces feuillets β aux hélices. Cinq de ces boucles, en contact avec le cytosol, déterminent les domaines actifs des protéines ras.

Par des expériences in vitro de mutagenèse dirigée et grâce à l'analyse de séquences de mutants ayant perdu leur capacité de lier et d'hydrolyser le GTP, les domaines catalytiques et effecteurs ont pu être localisés dans la séquence primaire des protéines ras (Fig.8, p.42) (Barbacid, 1987; Broach & Deschesnes, 1990). Ainsi,

- en position 60-76, se situe **la région flexible**, site de reconnaissance par l'anti-corps anti-p21, Y13-259.
- le **site de liaison du GTP et du GDP** est localisé dans les régions des acides aminés 5-22 et 109-120 (homologie avec les

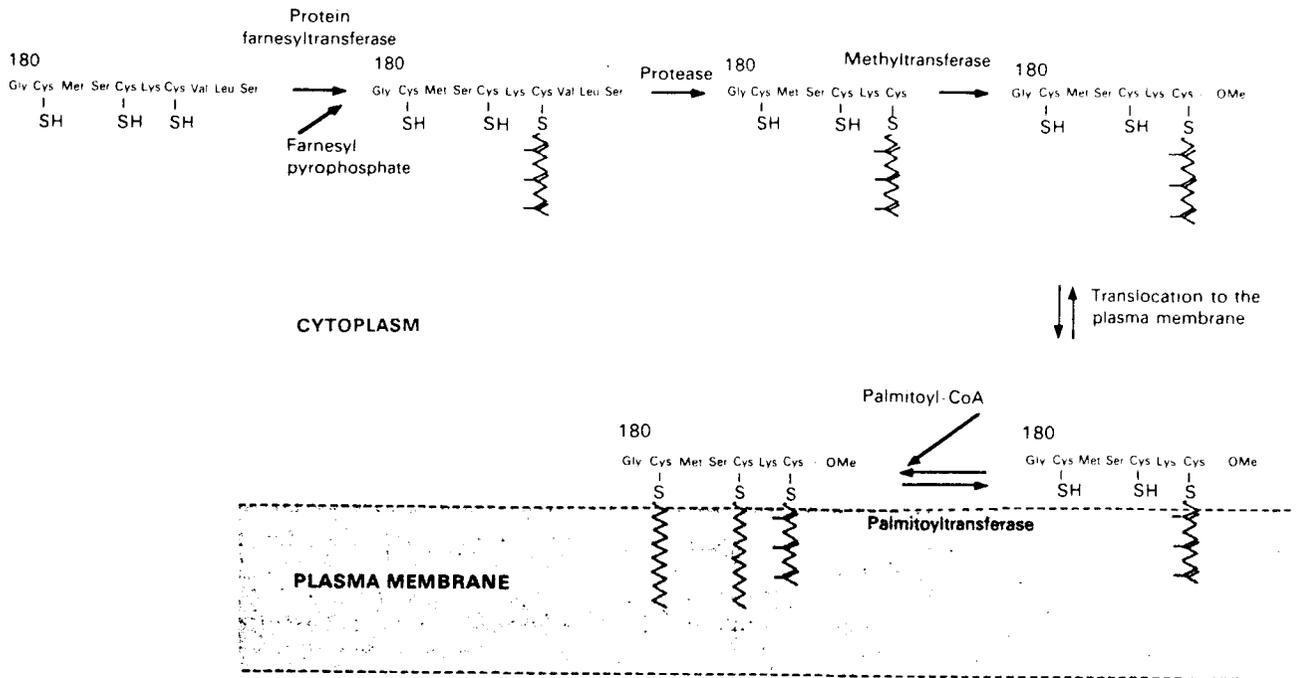


Figure 10 : Modifications post-transductionnelles de l'extrémité C-terminale des protéines c-Ha-ras (Grand & Owen, 1991) (voir texte).

protéines G) et dans les régions 59-63, 130-145 et 152-165.

- le **domaine effecteur** est situé entre les résidus 30 et 42
- et le **domaine de fixation à la membrane plasmique** entre les résidus 186 et 189.

II - FIXATION A LA MEMBRANE PLASMIQUE.

Pour être fonctionnellement actives, les protéines p21 nécessitent d'être fixées à la face interne de la membrane plasmique. Cette fixation s'effectue consécutivement à une modification post-traductionnelle qu'elles subissent après reconnaissance du signal que constitue la CAAX Box (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique). Cette modification qui consiste en une acylation de la Cys¹⁸⁶ par l'acide palmitique, est en fait réalisée en deux temps (Fig.10, p.44) :

1°) La pro-p21 cytoplasmique est transformée en un intermédiaire après trois modifications successives:

- une réaction de farnésylation de la cystéine¹⁸⁶,
- une coupure des 3 résidus d'acides aminés terminaux
- et une réaction de carboxylation de la cystéine 186. La p21 est alors intégrée dans la membrane plasmique par translocation.

2°) Une ou/et deux des cystéines les plus proches de la cystéine terminale (cystéines 181 et 184 pour la p21^{Ha-ras}) subissent ensuite une réaction de palmitoylation par une acyltransférase spécifique intégrée dans la membrane. Dans le cas de la protéine c-Ha-ras, l'ancrage à la face interne de la membrane plasmique se fait donc grâce à trois chaînes d'acide gras (Revue de Grand & Owen, 1991).

III - ACTIVATION DES PROTO-ONCOGENES CELLULAIRES ras.

Depuis la mise en évidence de l'implication des oncogènes ras dans la formation de tumeurs humaines, il a pu être démontré que leurs capacités transformantes résultaient principalement de leur activation par des mutations ponctuelles. Les oncogènes cellulaires Ha-ras et Ki-ras isolés de tumeurs humaines présentaient une substitution du résidu Gly¹² ou du résidu Gln⁶¹ par tout autre acide aminé (sauf Pro ou Glu), tandis que le gène N-ras présentait une substitution du résidu Gly¹³. Alors qu'il semble qu'une seule mutation ponctuelle soit nécessaire pour conférer à ces proto-oncogènes cellulaires leur caractère transformant, les oncogènes viraux quant à eux portent 2 mutations, l'une située dans le codon 12 et la seconde résultant toujours de la substitution de l'Ala⁵⁹ en Thr⁵⁹. Cette dernière mutation confère aux protéines virales une activité d'autophosphorylation GTP-dépendante qui n'a pas encore pu être corrélée à leur pouvoir transformant (Shih et al., 1980).

Il faut noter qu'un autre mécanisme d'activation des proto-oncogènes ras a été décrit dans certains types de tumeurs humaines (Tab.IV, p.37). Ce mécanisme d'activation par amplification génique résulte d'une surexpression de la protéine p21 normale, qui présente à des taux anormalement élevés dans la cellule, va hydrolyser le GTP de manière quantitativement plus importante et, en conséquence, induire la transformation maligne de la cellule.

IV - PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PROTEINES ras.

Les propriétés biologiques des protéines p21^{ras} n'ont pas encore été totalement éclaircies. Toutefois, au vu de certains résultats obtenus dans de nombreux laboratoires, il semblerait que ces protéines soient impliquées :

- dans les **mécanismes de prolifération cellulaire de base** puisque les proto-oncogènes sont plus fortement exprimés dans les tissus prolifératifs tels que le foie en régénération que dans les autres tissus (Goyette et al., 1983).

- dans les **mécanismes de différenciation cellulaire** du fait que l'expression de ces proto-oncogènes soit quantitativement augmentée au cours du développement embryonnaire de la Souris (Slamon & Cline, 1984) et que d'autre part, la transfection de l'oncogène ras dans les cellules neurales PC12 induise leur différenciation terminale.

- et de façon plus générale, dans le **contrôle de la croissance cellulaire** des fibroblastes. Il semblerait, d'après les résultats obtenus à partir de nombreuses études effectuées sur différentes lignées fibroblastiques de Rongeurs, que les p21^{ras}, à l'instar des autres protéines G, soient capables de transduire un signal mitotique extracellulaire depuis un récepteur activé. Ainsi, certains laboratoires ont pu montrer que la transformation de fibroblastes par des oncogènes ras, induisait une augmentation de la production par ces cellules d'un facteur de croissance homologue à l'EGF, le TGF- α , produisant ainsi un signal de croissance auto-entretenu et laissant à penser que les produits des gènes ras contrôlent la transduction d'un signal de croissance depuis le récepteur de l'EGF.

En outre, il fût également proposé que les protéines ras puissent intervenir comme les protéines G dans le métabolisme des phosphatidylinositols en induisant la production de deux "seconds messagers", le DAG et l'IP₃. Toutefois, cette hypothèse semble actuellement être remise en

question à la lumière de résultats plus récents (revue de Woodgett, 1992).

V - PROPRIETES BIOCHIMIQUES.

1 - Activité GTPasique.

Les protéines traduites des gènes de la famille ras sont capables de fixer les nucléotides à guanine (GTP et GDP) avec une forte affinité (constante de dissociation : 10^{-11} M) et possèdent une activité GTPasique intrinsèque très faible (turn-over : 2 mmol/min/mol). Si elles libèrent au cours de cette hydrolyse du phosphate inorganique, elles ne sont toutefois pas capables de le transférer par réaction de phosphorylation. Par ces propriétés intrinsèques, les p21 présentent donc une homologie fonctionnelle avec le facteur EF-Tu d'Escherichia coli et avec les sous-unités α des protéines G. De fait, les p21 présentent également une homologie de séquence avec ces molécules puisque certains de leurs domaines et notamment les régions entre les résidus d'acides aminés 5-22 et 109-120 sont fortement homologues avec les sous-unités α de :

- la protéine Gs qui active l'adénylate cyclase en réponse à des stimuli β -adrénergiques,
- la protéine Gi qui active la phospholipase C
- et la transducine qui régule la GMPc phosphodiesterase lors de la transduction des signaux visuels.

Comme toutes ces protéines G, les protéines p21 existeront donc sous deux formes, une forme active liée au GTP et une forme dite "inactive" liée au GDP. Dans la majorité des cellules examinées, la p21^{ras} est majoritairement sous la forme liée au GDP, l'activité GTPasique constitutive de ces protéines est donc faible. Par contre,

lorsque ces protéines sont oncogéniques, suite aux mutations ponctuelles dans les codons 12, 13, 59 ou 61, le site catalytique étant modifié, les p21 ne seront alors plus capables d'hydrolyser le GTP et resteront en conséquence sous leur forme active. Il en résultera une transduction permanente du signal qui sera capable d'induire la transformation maligne de la cellule.

2 - Les effecteurs.

Afin de comprendre par quels mécanismes les protéines ras oncogéniques sont capables d'induire une croissance anarchique, voire la transformation maligne des cellules dans lesquelles elles sont exprimées, il était primordial de définir par quel(s) mécanisme(s) les protéines normales traduites du proto-oncogène interviennent dans le contrôle de la croissance cellulaire. Pour cela, il était nécessaire de caractériser la ou les molécules cibles de ras dont l'activité est régulée par l'activité GTPasique des p21^{ras}.

Ainsi, certains laboratoires, en se fondant sur l'homologie structurale et fonctionnelle existant entre les p21^{ras} et les protéines G, ont étudié dans différents modèles cellulaires l'effet de l'activation oncogénique des gènes ras sur les effecteurs des différentes protéines G. Hormis l'adénylate cyclase dont l'activité est effectivement régulée par les protéines RAS de Saccharomyces cerevisiae (Fraenkel, 1985) et le cas isolé de la coopération entre les p21 et la phosphokinase C AMPc-dépendante observée dans un modèle de cellules de mammifères (Francks et al., 1989), aucune des protéines cibles des protéines G connues ne semble être un effecteur des proto-oncogènes ras.

De même, si l'on suppose que les p21^{ras} puissent servir de relais au signal mitotique du TGF- α dans les fibroblastes de rongeurs, il n'a

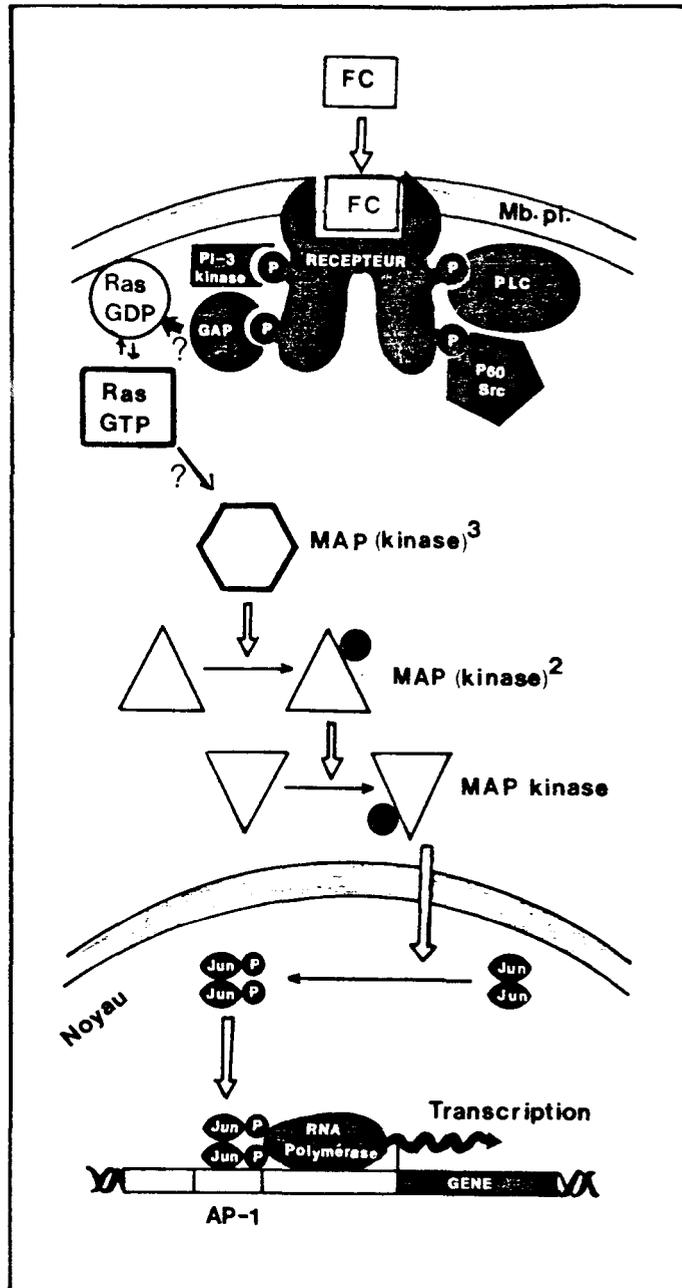


Figure 11 : Mécanisme de transduction de signaux extracellulaires impliquant les protéines ras.

La p21^{ras} est activée en conséquence d'une stimulation d'un récepteur tyrosine-kinasique. En réponse à cette activation, une cascade d'activités kinasiques sont mises en jeu pour aboutir à une activation des kinases MAP. Une des cibles de ces enzymes est le facteur de transcription c-Jun qui activé, va stimuler la transcription du gène cible (Woodgett, 1992).

toutefois pas encore été possible jusqu'à présent de caractériser une molécule cible d'un tel système de transduction.

Il apparaît donc que l'intervention des p21^{ras} dans le contrôle de la transduction des signaux mitotiques se fasse par un mécanisme plus complexe que celui décrit pour les protéines G et fasse intervenir un ou plusieurs produits d'autres proto-oncogènes cellulaires. Ainsi, depuis la mise en évidence d'une rapide activation des kinases MAP (mitogene activated protein) qui pourraient correspondre au produit du proto-oncogène c-raf, en conséquence d'une dérégulation de l'activité des protéines ras (Leevers & Marshall, 1992), il semblerait que l'un des effets biologiques des produits de cette famille de gènes consiste en une activation du complexe AP-1 par l'intermédiaire d'une cascade de réaction de phosphorylation par des Ser/Thr-kinases (Woodgett, 1992) (Fig.11, p.50).

VI - CONTROLE DE L'ACTIVITE DES p21^{ras} ET LE CYCLE GDP/GTP.

Comme toute molécule impliquée dans la voie de transduction des signaux mitotiques, les p21^{ras} sont l'objet d'une régulation rigoureuse appelée "le cycle GDP/GTP".

1 - Régulation négative par les protéines GAP.

La famille des protéines GAP (GTPase-activating proteins) est une large famille de protéines cytoplasmiques qui activent spécifiquement les activités GTPasiques intrinsèques des protéines G. Or, certaines de ces protéines appelées rasGAP sont capables de se fixer de manière spécifique sur les protéines ras et de faciliter la réaction :

GTP-ras ----> GDP-ras + Pi. Les protéines rasGAP ont pu être purifiées et clonées. Une protéine de 120 kDa a été isolée du cerveau

humain (Gibbs et al., 1988; Vogel et al., 1988) alors que 2 isoformes de 100 et de 120 kDa ont été purifiées du placenta humain (Trahey et al., 1988). On connaît maintenant le mécanisme d'action de la protéine p120-GAP (Martin et al., 1990; Xu et al., 1990). Celle-ci, une fois activée par phosphorylation sur une tyrosine suite à son interaction avec les récepteurs du PDGF, de l'EGF ou du CSF-1 (colony-stimulating factor) (Molloy et al., 1989; Kaplan et al., 1990; Ellis et al., 1990; Margolis et al., 1990; Reedijk et al., 1990) ou avec les produits des oncogènes v-src, v-fps et v-abl (Ellis et al., 1990), va pouvoir se fixer spécifiquement et de façon GTP-dépendante sur la protéine p21 normale au niveau de la région effectrice. L'activité GTPasique intrinsèque des p21 est dans ces conditions, activée d'un facteur ± 100 .

Une autre protéine GAP spécifique du produit de ras a été identifiée récemment. Cette protéine est en fait codée par le gène NF1, responsable de la maladie de von Reckling-Hausen (Neurofibromatosis Type 1) et tout comme la rasGAP, elle est capable d'activer spécifiquement l'activité GTPasique intrinsèque des protéines p21.

Les protéines p21 mutées et oncogéniques échappent quant à elles au contrôle de GAP et de NF1, celles-ci bien que capables de se fixer sur les protéines oncogéniques (Vogel et al., 1988), n'activent pas leur activité GTPasique (Trahey & McCormick, 1987). Ainsi les p21 oncogéniques restent sous la forme active liée au GTP, transduisant en permanence un signal mitotique.

2 - Régulation positive.

Tsai et al. (1990) ont isolé d'une fraction cytoplasmique une pro-

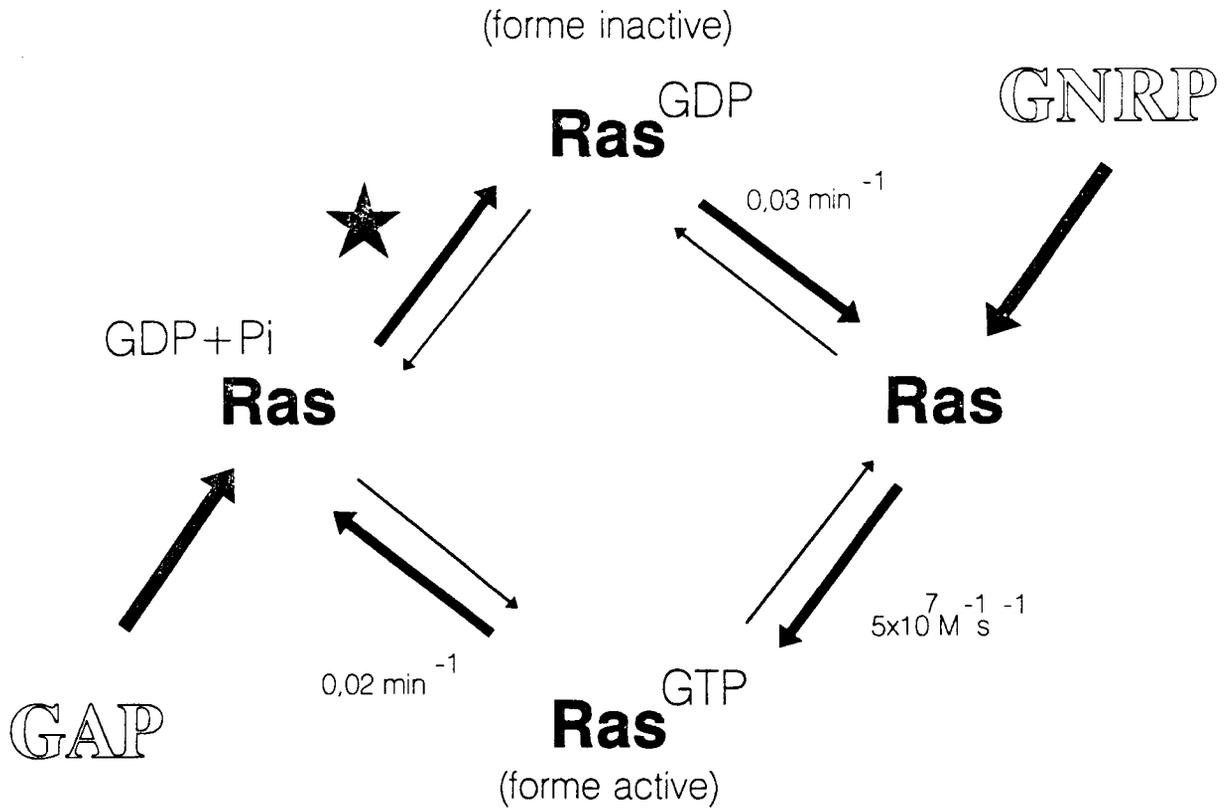


Figure 12 : Cycle GDP/GTP des p21^{ras}.

L'utilisation efficace de ce cycle tel qu'un mécanisme biologique nécessite une forte affinité pour les nucléotides et une faible activité GTPasique intrinsèque. La stimulation par GNRP ou par GAP accélère les deux étapes du cycle. * indique que la libération du phosphate inorganique est rapide et n'a pas d'influence limitante sur la conversion de la protéine ras depuis la forme liée au GTP en la forme liée au GDP (Haubruck & McCormick, 1991).

téine "GTPase inhibiting". Cette molécule de poids moléculaire apparent de 60 kDa est activée par liaison de phospholipides et s'associe directement, tout comme GAP, avec les p21. Par contre, contrairement à GAP, cette p60 peut interagir indifféremment avec les 2 formes de la p21 (liée au GTP ou liée au GDP). In vitro, cette protéine inhibitrice de l'activité GTPasique est active lorsque la p21 est en excès dans le milieu (50 fois) indiquant que l'inhibition de l'activité GTPasique se ferait après la dissociation (Tsai et al., 1990).

Un autre activateur de l'activité des protéines ras a été identifié par 3 groupes différents et appelé GNRP (Guanine nucleotide releasing protein). Cette protéine catalyse l'échange des nucléotides entre la p21 et le "pool" cytoplasmique (West et al., 1990; Wolfman & Macacra, 1990; Downward et al., 1990). En activant la libération du GDP, cette GNRP active la fixation du GTP sur la p21, donc sa conversion en sa forme active.

3 - Le cycle GDP/GTP.

Ainsi le cycle de contrôle de l'activité des protéines ras peut être schématisé de la façon suivante (Fig.12, p.53) :

- Les protéines ras sont normalement trouvées dans les cellules sous leur forme inactive, liée au GDP.

- L'activation des p21 se fera par liaison du facteur GNRP qui favorise la libération du GDP. La protéine alors libre va se fixer préférentiellement au GTP bien que son affinité pour les deux nucléotides soit équivalente. En effet, la concentration intracytoplasmique du GTP ($65 \text{ pmol}/10^7$ cellules) étant largement supérieure à celle du GDP (5

pmol/10⁷ cellules), cette disponibilité du produit induira une fixation préférentielle du GTP sur la p21.

- Etant alors sous sa forme active, la protéine va pouvoir fixer la protéine GAP ou la protéine NF1 qui vont activer son activité GTPasique intrinsèque.

- Après l'hydrolyse du GTP et la libération du phosphate inorganique, la p21 se retrouve à nouveau sous sa forme inactive et le cycle peut à nouveau être utilisé.

VII - ONCOGENE RAS ET CANCERS HUMAINS.

Il a été montré que les gènes de la famille ras étaient activés dans plus de 15% des tumeurs humaines (Bos, 1989) mais que, toutefois, leur incidence semblait varier en fonction du type de tumeur. Ainsi, par exemple, le proto-oncogène c-Ki-ras qui est activé par une mutation ponctuelle dans le codon 12, est activé dans 90% des carcinomes du pancréas (Almoguera et al., 1988; Smit et al., 1988), dans 50% des adénocarcinomes du poumon (Slebos et al., 1990) et dans 40 % des adénocarcinomes du colon (Vogelstein et al., 1988; Perucho et al., 1989). Par ailleurs, ces mutations varient quantitativement en fonction du stade de la maladie. En effet, alors que ces mutations du gène Ki-ras sont observables dès les stades précoces du déclenchement du mécanisme tumoral, elles ont une fréquence de plus en plus importante durant les stades tardifs du développement de la tumeur (Perucho et al., 1989; Fearon & Vogelstein, 1990). Ainsi, des techniques récentes de détection rapide et hautement sensibles des mutants de Ki-ras (détection d'1 mutant dans le codon 12 de l'allèle humain c-Ki-ras parmi 10⁴ copies du type sauvage) (Kahn et al., 1991) permet d'établir un pronostic de l'état d'avancement de la maladie à partir de biopsies.

III - LA TRANSFORMATION MALIGNNE.

Nous avons vu que, selon la "théorie unificatrice de la genèse des cancers", il était admis aujourd'hui que la formation de tumeurs résultait d'une dérégulation des systèmes de contrôle de la croissance cellulaire consécutive à une modification de gènes normaux présents dans les cellules et, en l'occurrence, consécutive à une altération des proto-oncogènes cellulaires.

Ainsi, une cellule qui aura acquis de la sorte la capacité de croître et de se diviser sans répondre aux systèmes de régulation, donnera naissance à des cellules filles ayant les mêmes caractéristiques. On obtiendra alors un clône de cellules qui continue de croître et de s'étendre jusqu'à devenir ce que l'on appelle une tumeur. Il existe toutefois 2 types de tumeurs, les tumeurs à caractère bénin et les tumeurs malignes ou néoplasiques. Dans le cas bénin, la tumeur est délimitée par une capsule fibrillaire et reste localisée dans le tissu. Par ailleurs, les cellules gardent une similitude morphologique et fonctionnelle avec les cellules normales environnantes. A l'inverse, les tumeurs néoplasiques vont acquérir la capacité d'envahir le tissu environnant et d'essaimer dans l'organisme pour aller s'implanter dans d'autres tissus ou organes, parfois lointains de leur site d'origine, afin d'y former les tumeurs secondaires. Ce phénomène, arrivant dans la phase ultime des cancers, est appelé métastase.

Afin de comprendre les mécanismes régissant l'acquisition des capacités d'invasion et d'essaimage des cellules malignes, il était important de trouver des modèles cellulaires malins permettant les études in vitro.

TABLEAU VI :

LES CRITERES DE TRANSFORMATION MALIGNNE.

- Modifications morphologiques :

- * Les cellules transformées en culture deviennent sphériques et réfringentes traduisant ainsi les changements que subit le cytosquelette, en particulier la perte des filaments d'actine.

- Croissance in vitro :

- * Les cellules transformées se multiplient jusqu'à atteindre une densité de saturation anormalement élevée.
- * Elles perdent la notion de l'inhibition de contact et sont capables de donner des cultures en multicouches.
- * Elles sont capables de se multiplier en milieu semi-solide et d'y former des clones.
- * Elles n'ont que très peu de besoin en sérum et présentent une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance.

- Comportement in vivo :

- * Les cellules transformées sont tumorigènes et induisent des tumeurs au point d'injection en système homologue.
- * Elles sont invasives.
- * Elles possèdent des propriétés angiogéniques.

- Caractéristiques biochimiques :

- * Le métabolisme cellulaire est modifié. On observe, en particulier, des troubles respiratoires, une augmentation du transport du glucose, une sécrétion de protéases et en particulier de l'activateur du plasminogène et des synthèses intenses d'ARN et de protéines.
- * Les cellules transformées expriment à leur surface des néo-antigènes marqueurs de transformation.
- * On observe une modification des activités nucléaires conduisant à l'altération de la vie sociale des cellules.

1 - Transformation cellulaire in vitro.

Les méthodes de transfection d'oncogènes dans des lignées de cellules établies en culture ont supplanté les techniques de transformation de cellules par exposition à des agents cancérigènes chimiques ou physiques ainsi que les mises en culture de cellules tumorales provenant de biopsies, et ceci car elles sont plus aisées à contrôler et à entretenir.

Dans tous les cas, les cellules transformées présentent à la fois des modifications morphologiques, biochimiques et génétiques qui ont pu être corrélées avec des altérations de leur comportement. Ces modifications phénotypiques et génotypiques ont permis d'établir une liste exhaustive des caractères de transformation (Tab.VI, p.57). Toutefois, la caractérisation phénotypique n'étant pas toujours suffisante pour définir la malignité des cellules, la seule définition de la malignité qui est généralement acceptée consiste en la démonstration de la formation de tumeurs invasives ou métastasantes après injection sous-cutanée d'un certain nombre de cellules d'une lignée transformée chez des animaux immuno-déprimés ou immuno-déficients tels que les Souris "nude".

In vivo, le processus de transformation et de cancérogenèse s'effectue en plusieurs étapes : le déclenchement, le développement, la perte du contrôle de croissance, l'invasion et la formation des métastases (Nicolson et al., 1977). Les 3 premières étapes ayant pu être clarifiées grâce à l'étude des oncogènes, il reste donc à tenter de comprendre les mécanismes régissant les capacités d'invasion et de métastases des cellules tumorales.

2 - Invasion et métastase.

Le phénomène de métastase est un des problèmes cruciaux lors du traitement des patients atteints de cancer. Si les mécanismes sont

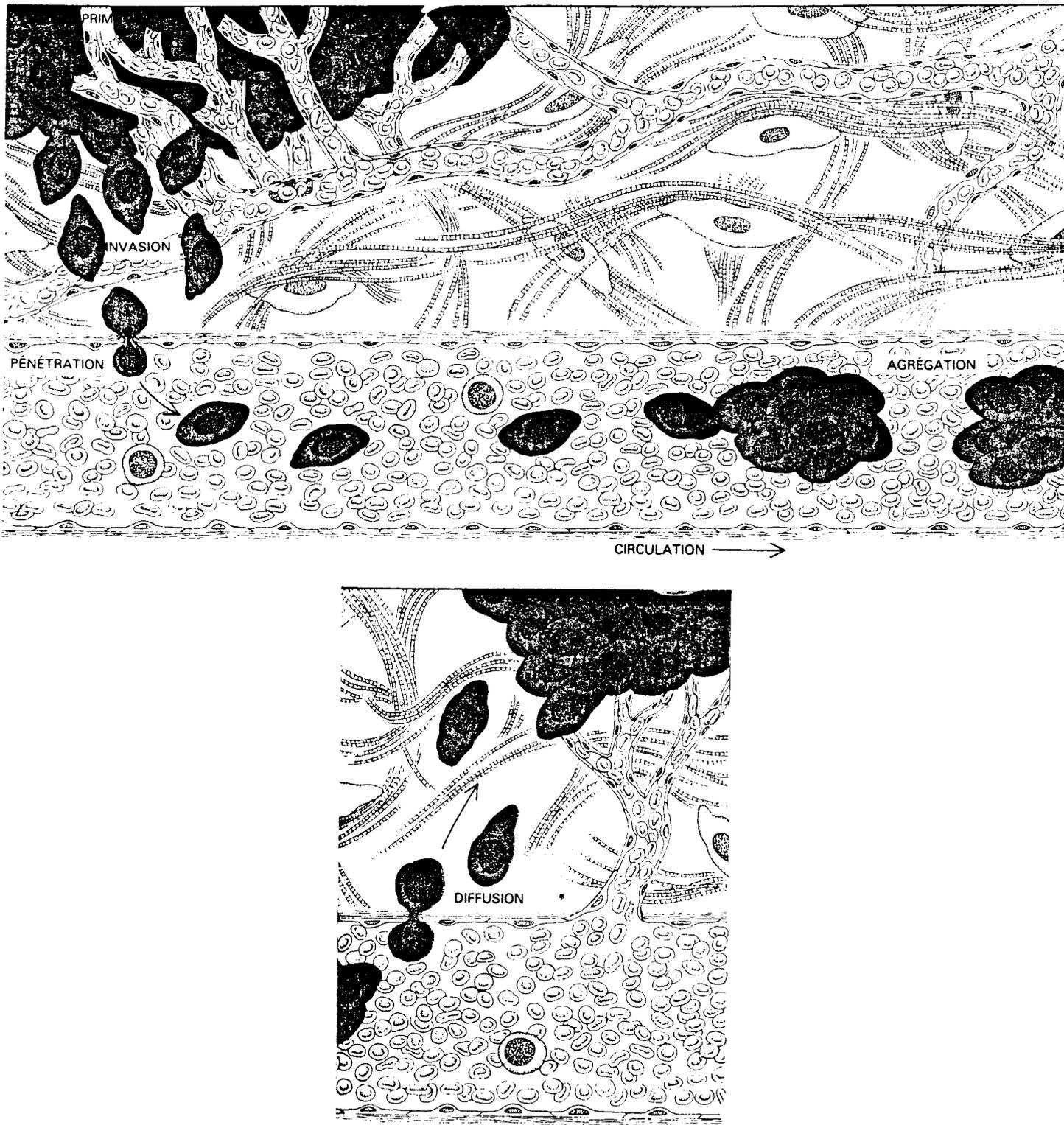


Figure 13 : Schéma du processus métastatique.

Une cellule tumorale doit se détacher de la tumeur d'origine, traverser le milieu intercellulaire (**invasion**), puis la paroi d'un vaisseau sanguin (**pénétration**), migrer dans le sang, sortir de la circulation sanguine à un endroit favorable, s'installer dans un nouveau tissu (**diffusion**), proliférer et provoquer le développement de nouveaux vaisseaux sanguins qui alimenteront la tumeur secondaire qui se formera. Dans le sang, certaines cellules tumorales s'aggrègent avec d'autres cellules métastatiques (d'après Feldman & Eisenbach, 1989).

encore mal compris, on pense que sont impliquées de nombreuses étapes telles que :

- * l'échappement des cellules tumorales depuis la tumeur primaire,
- * leur traversée du milieu intercellulaire,
- * puis de la paroi d'un vaisseau sanguin avoisinant,
- * la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine face aux cellules du système immunitaire,
- * leur attachement à la paroi endothéliale des vaisseaux,
- * la pénétration et la croissance dans un organe cible,
- * et enfin le développement de nouveaux vaisseaux qui alimenteront cette tumeur secondaire (Fig.13, p.59).

Toutes ces étapes sont en fait influencées par de nombreux facteurs tels que la surveillance immunitaire de l'hôte, l'antigénicité des cellules tumorales et l'apparition de nouvelles caractéristiques membranaires de ces cellules (Fidler & Balch, 1987; Nicolson, 1982; Poste & Fidler, 1980).

Des études de comparaison de cellules tumorales métastasantes ou non-métastasantes extraites de sarcomes ou de carcinomes murins ont permis de montrer :

1°) que les cellules tumorales acquièrent la capacité d'envahir les espaces intercellulaires et de traverser la paroi des vaisseaux sanguins grâce à la sécrétion de 2 enzymes clés : la collagénase de type IV qui hydrolyse le collagène IV, principal élément structural des parois des vaisseaux sanguins, et l'activateur du plasminogène.

2°) que les cellules métastasantes survivent mieux dans la circulation sanguine car elles présentent des modifications des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) à leur surface, ce qui leur permet d'échapper à l'attaque par les lymphocytes T cytotoxiques. Il a

ainsi pû être montré chez la Souris que les cellules tumorales métastasantés présentaient un rapport d'expression des antigènes H-2D/H-2K élevé alors que les cellules non-métastasantés exprimaient ces 2 antigènes en quantités égales. Cette diminution du taux d'expression du gène H-2K est consécutive à une diminution de l'expression du proto-oncogène fos. Les mêmes résultats ont été observés à partir de cellules de leucémies humaines.

3°) que certaines cellules tumorales forment plus facilement que d'autres de nouvelles tumeurs quand elles ont atteint leur organe cible et ceci parce qu'elles porteraient à leur surface un récepteur d'un facteur de croissance spécifique qui provoquerait leur prolifération. Ce récepteur serait codé par un gène proche au proto-oncogène fms (revue de Feldman & Eisenbach, 1989).

IV - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES

Les glycoconjugués regroupent à la fois les glycolipides et les glycoprotéines et sont aussi bien des constituants des membranes plasmiques que des composés circulants des liquides biologiques. Quelque soit la nature du lipide ou de la protéine, la synthèse du glycane s'effectue toujours par addition successive et séquentielle de monosaccharides (Glc, Man, Gal, GlcNAc, GalNAc, Fuc, NeuAc) à partir d'un donneur activé, un glycosyl-nucléotide, et grâce à l'activité catalytique des glycosyltransférases.

Ces enzymes sont pour la plupart, des enzymes transmembranaires localisées dans le RER et dans l'appareil de Golgi (Roth, 1987; Duncan & Kornfeld, 1988). Elles présentent toutes une spécificité très étroite vis-à-vis de la structure acceptrice, vis-à-vis du donneur de monosaccharide à transférer et vis-à-vis du type de liaison formée. A titre d'exemple, la spécificité des principales glycosyltransférases intervenant dans la biosynthèse des glycoprotéines est donnée dans les tableaux VII (p.63) et VIII (p.64). Ainsi, en se référant aux structures glycaniques qui ont pu être déterminées jusqu'à ce jour, il existerait plus d'une centaine de glycosyltransférases différentes (Schachter, 1991). Actuellement, un grand nombre d'entre elles ont pu être purifiées et plus d'une dizaine ont été clonées chez les mammifères (Gillespie et al., 1992; Shaper et al., 1992; Wen et al., 1992a; revue de Paulson & Colley, 1989 et de Schachter, 1991). Bien que l'on ait pu observer que ces enzymes présentent un spectre d'expression spécifique selon les espèces et/ou les tissus et que, par ailleurs, leur activité varie au cours du développement et de la différenciation cellulaire, on

Tableau VII : Glycosyltransférases intervenant dans l'élongation des antennes des N-glycannes.

Liaison synthétisée	Glycosyltransférase	n° EC
NeuAcaα2-6Galβ1-4GlcNac-	α 2,6-sialyltransférase	2.4.99.1
NeuAcaα2-3Galβ1-4GlcNac-	α 2,3-sialyltransférase	2.4.99.6
Galβ1-4GlcNac-	β 1,4-Gal-transférase	2.4.1.38/90
GalNacβ1-4GlcNac	β 1,4-GalNac-transférase	
GlcNacβ1-6	β 1,6-GlcNac-transférase V	
GlcNacβ1-2Manα1-6	β 1,2-GlcNac-transférase II	2.4.1.143
GlcNacβ1-4-Manβ1-4-R	β 1,4-GlcNac-transférase III	2.4.1.144
GlcNacβ1-2Manα1-3	β 1,2-GlcNac-transférase I	2.4.1.101
GlcNacβ1-4	β 1,4-GlcNac-transférase IV	2.4.1.145
-Manβ1-4GlcNacβ1-4GlcNac-Asn-		
Fucaα1-6	α 1,6-fucosyltransférase	2.4.1.68

Tableau VIII : Glycosyltransférases intervenant dans la synthèse des O-glycannes.

Liaison synthétisée	Glycosyltransférase	n° EC
GalNAcα-Ser/Thr	peptide α GalNAC-transférase	2.4.1.41
Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr	core1 β 1-3Gal-transférase	2.4.1.122
Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr /		
GlcNAcβ1-6	core2 β 1-6GlcNAC-transférase	2.4.1.102
GlcNAcβ1-3GalNAcα-Ser/Thr	core3 β 1-3GlcNAC-transférase	2.4.1.147
GlcNAc β 1-3GalNAc α -Ser/Thr /		
GlcNAc1-6	core4 β 1-6GlcNAC-transférase	2.4.1.148
GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-Ser	core1 élancement GlcNAC-transférase	2.4.1.146
GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-Ser /		
GlcNAc β 1-6	core2 élancement GlcNAC-transférase	2.4.1.146
NeuAcα2-6(R)GalNAcα-Ser/Thr	α 2,6 sialyltransférase I	2.4.99.3
NeuAc α 2-6GalNAc α -Ser/Thr /		
NeuAc α 2-3Gal β 1-3	α 2,6 sialyltransférase II	2.4.99.7
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcα-Ser	α 2,3 sialyltransférase	2.4.99.4

ne connaît encore que très peu de choses quant à leur régulation génique.

En contre partie, on dispose actuellement d'une plus grande masse d'informations quant aux glycanes eux-mêmes. Ainsi, il est largement établi aujourd'hui que les glycanes ont des fonctions biologiques importantes. Ils permettent, entre autre, de contrôler :

- les propriétés physico-chimiques des glycoprotéines circulantes (solubilité, stabilité conformationnelle)
- et le taux de protéolyse des protéines, permettant aux glycoprotéines de conserver leur intégrité fonctionnelle (Rademacher et al., 1988).

En outre, ils sont nécessaires à l'activité biologique ou biochimique de certains glycoconjugués et ont également des fonctions intrinsèques. Qu'ils soient liés à un lipide ou à une protéine, les glycanes sont des signaux de reconnaissance; ils sont aussi bien :

- des récepteurs,
- des signaux permettant le ciblage de certaines molécules,
- ou des déterminants antigéniques (revu par Rademacher et al., 1988).

En particulier, de par leur exposition externe à la surface des cellules, les glycanes des glycoconjugués membranaires vont jouer un rôle primordial dans les phénomènes de reconnaissance intercellulaire et, en conséquence, seront impliqués dans des événements biologiques tels que la différenciation, l'adhésion et la mobilité cellulaires. A titre d'exemple, par leur reconnaissance par des sélectines (ou LEC-CAM), qui regroupent une famille de molécules d'adhésion, ils vont permettre

l'adhérence sélective des lymphocytes et des monocytes à certains endothélia vasculaires.

De cette façon, toute modification de la structure de ces glycanes qui apparaîtra lors de phénomènes physiologiques ou pathologiques, aura une influence sur le comportement des cellules.

Ainsi, nombre de laboratoires ont pu montrer, d'une part, que la transformation maligne des cellules par voie virale, chimique ou physique ou encore par transfection d'oncogènes induisait des modifications de la structure des glycanes similaires à celles observées à partir de cellules tumorales, et d'autre part, que ces modifications étaient en corrélation avec le pouvoir invasif et métastatique de ces cellules.

D'une façon générale, les cellules isolées de tumeurs montrent :

- une simplification des structures glycaniques des glycolipides due soit à une synthèse incomplète, soit à une néosynthèse de structures plus légères (revue de Hakomori & Kannagi, 1983)

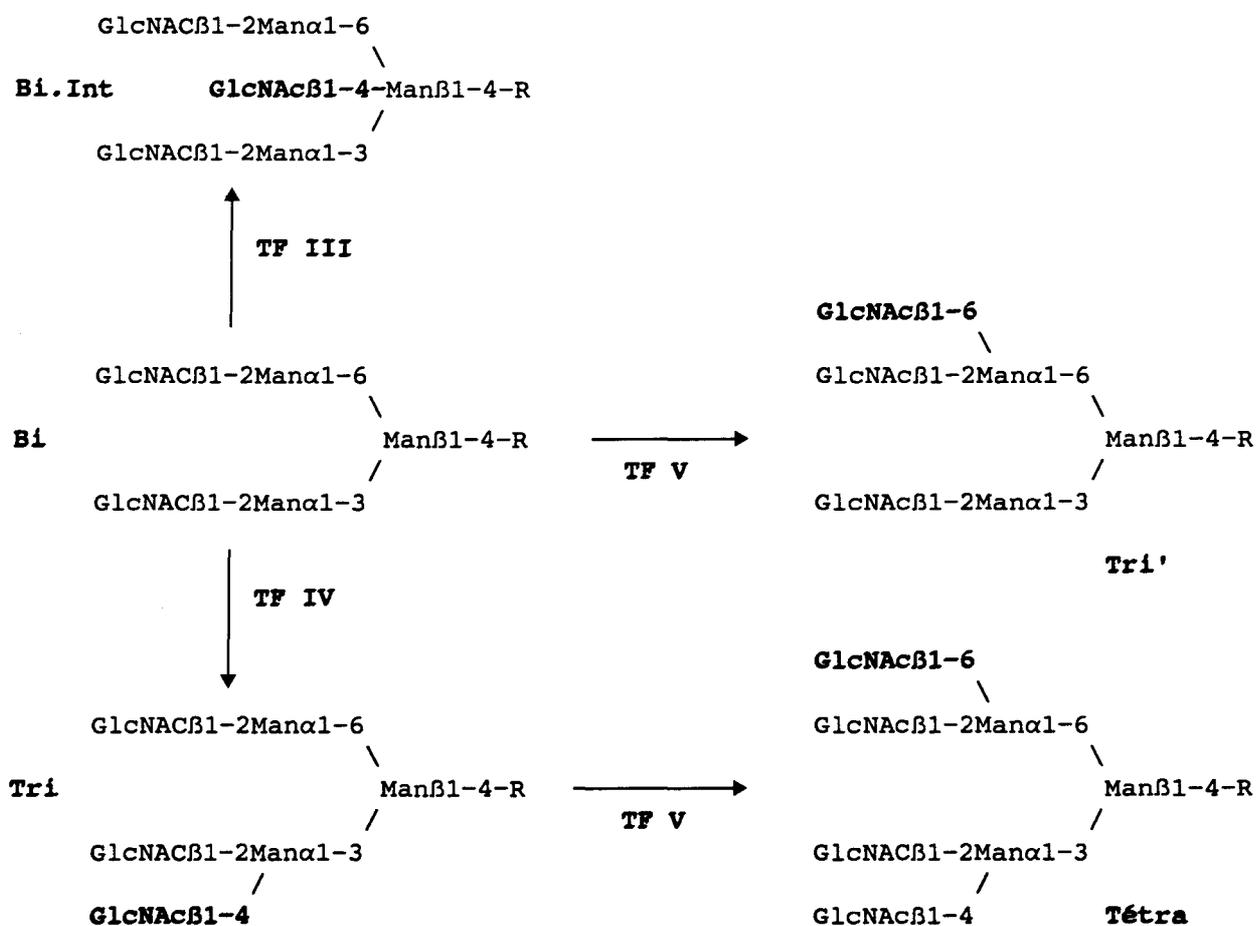
- et une augmentation de la taille des glycanes des O- et des N-glycosylprotéines accompagnée de perturbations de la glycosylation terminale.

Néanmoins, il faut toutefois noter que ces variations structurales n'affectent principalement que les glycanes de type N-acétyllactosaminique des N-glycosylprotéines (Buck et al., 1970). Ainsi, l'élévation de la masse moléculaire de ces structures résulte-t-elle (voir la revue de Dennis, 1988) :

- d'une augmentation du nombre et/ou de la longueur des antennes (Fig.14, p.66) respectivement liées à l'élévation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Fig.15, p.68) et de la β 1-3 N-acétylglucosaminyltransférase.

Figure 15 : Différentes N-acétylglucosaminyltransférases (TF) intervenant dans l'antennarisation du noyau pentasaccharidique des N-glycannes.

Bi : structure bi-antennée; Tri et Tri' : structures tri-antennées; Tétra : structure tétra-antennée. (Dennis, 1988)



R = GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn

- et d'une hypersialylation des structures (Fig.14, p.66) consécutive à l'augmentation de l'activité des sialyltransférases.

Etant donné que nos travaux ont été consacrés essentiellement à l'étude des modifications de la sialylation accompagnant la transformation maligne, nous allons nous limiter dans les chapitres suivants à la description des acides sialiques et surtout des enzymes catalysant leur transfert, les sialyltransférases.

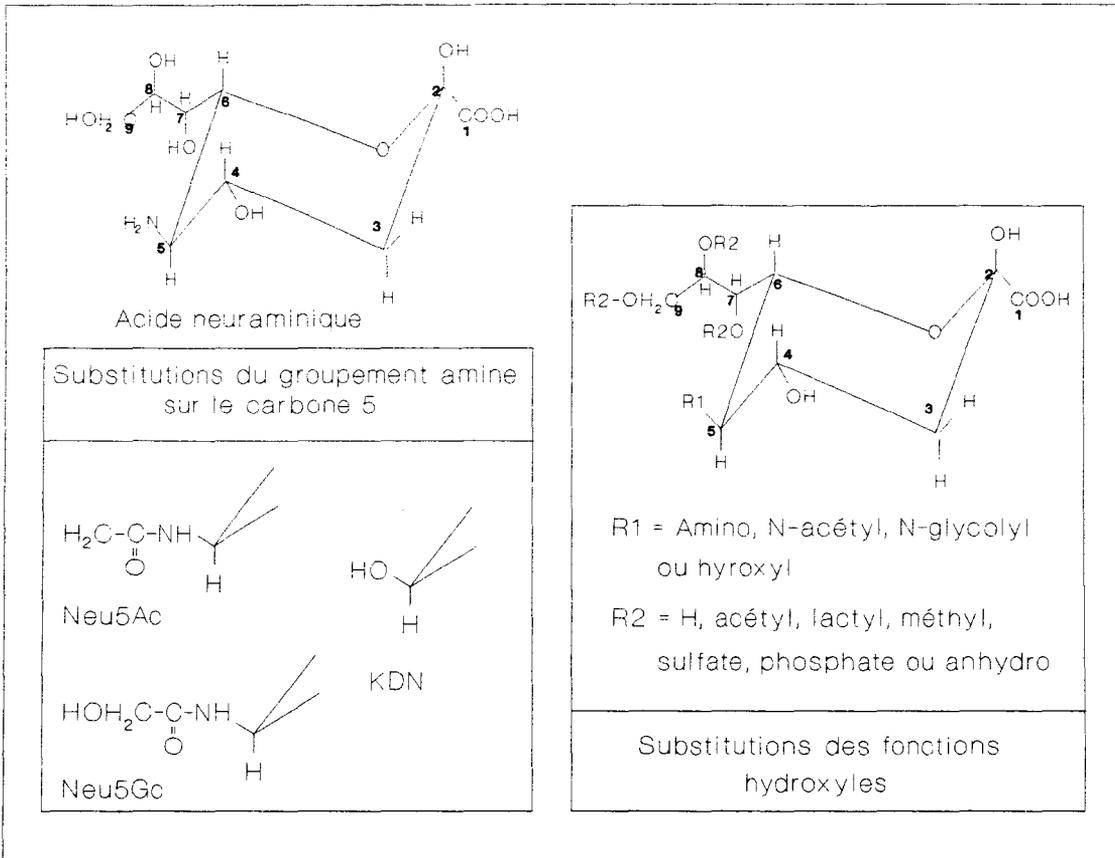


Figure 16 : L'acide neuraminique et ses dérivés naturels.

V - LES ACIDES SIALIQUES ET LES SIALYLTRANSFERASES

I - LES ACIDES SIALIQUES.

Les acides sialiques constituent une famille de monosaccharides acides qui sont très largement répartis dans la nature et particulièrement dans le règne animal. Il a fallu presque une trentaine d'années pour établir la structure de l'acide N-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) et depuis la découverte de cette molécule qui remonte maintenant à une cinquantaine d'années (revue de Faillard, 1989), près d'une quarantaine d'acides sialiques différents ont pu être caractérisés à ce jour, grâce notamment aux nouvelles techniques physico-chimiques (Varki, 1992).

1 - Structure des acides sialiques.

Les acides sialiques composent une famille de molécules dérivant toutes de l'acide neuraminique (acide 5-amino-3,5-didésoxy-D-glycéro-D-galacto-nonulosique). Cette molécule se distingue des autres monosaccharides entrant dans la composition des glycanes par un squelette carboné à 9 carbones portant à la fois une fonction acide au niveau du carbone 1 et une fonction amine sur le carbone 5 (Fig.16, p.70).

A partir de cette molécule, la substitution de la fonction amine et/ou des différentes fonctions hydroxyles conduira à l'apparition des diverses molécules composant la famille des acides sialiques (Fig.16, p.70).

Parmi les membres de cette famille, les molécules les plus fréquemment rencontrées dans la nature sont l'acide N-acétyl-neuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolyl-neuraminique (Neu5Gc) qui se caractéri-

sent respectivement par une substitution de la fonction amine par un radical acétyl ou par un radical glycolyl (Fig.16, p.70).

2 - Les acides sialiques dans la composition des glycoconjugués.

Les acides sialiques sont majoritairement rencontrés chez les mammifères liés à des glycanes. Leur transfert sur une structure glycanique à partir du donneur CMP- β -NeuAc résulte de l'activité de glycosyltransférases spécifiques : **les sialyltransférases**. La liaison glycosidique se fait toujours en anomérie α et en position :

- 3, 4 ou 6 sur le galactose,
- 6 sur la N-acétyl-galactosamine,
- 4 ou 6 sur la N-acétylglucosamine
- et 8 ou 9 sur un acide sialique.

Enfin, les acides sialiques peuvent être parfois rencontrés en position interne dans les structures glycaniques, mais occupent toutefois principalement une position terminale non-réductrice chez les organismes supérieurs (revue de Schauer, 1982).

3 - Rôles des acides sialiques.

La large distribution des acides sialiques témoigne de leur importance biologique et leur rôles physico-chimiques, comme biologiques, sont à la fois liés à leur caractère acide et à leur position externe sur les glycoconjugués.

a) Rôles physico-chimiques.

Par leur caractère acide, les acides sialiques confèrent aux glycanes une charge négative :

- liés à des glycoconjugués membranaires, les acides sialiques contribuent, au même titre que les groupements phosphates et sulfates,

à la **charge négative** de la surface cellulaire, avec les conséquences possibles d'une répulsion électrostatique entre les cellules comme cela a été décrit dans le cas de plaquettes sanguines et d'érythrocytes (Cook et al., 1961; Jeanloz et Codington, 1976). Par ailleurs, en intervenant dans la formation de ponts calciques, cette charge négative peut également permettre l'aggrégation de certains types cellulaires (Kemp et al., 1970).

- ils contrôlent l'intégrité structurale et fonctionnelle de certaines glycoprotéines circulantes. Un exemple peut être donné par les mucines, O-glycosylprotéines des muco bronchiques, gastriques ou salivaires, qui possèdent un fort rapport axial dans leur structure. Ce rapport axial, responsable de leur conformation linéaire en bâtonnet, confère à ces glycoprotéines leur propriété caractéristique de viscosité. Cette conformation particulière est maintenue grâce aux répulsions entre les charges électronégatives des acides sialiques, répartis de manière régulière le long du polypeptide. Lorsque l'on désialyle des mucines, elles acquièrent une conformation globulaire et perdent leur viscosité.

b) Rôles biologiques.

* Du fait de leur position essentiellement externe dans les structures glycaniques et du fait de leur caractère acide, les acides sialiques vont jouer un rôle primordial dans les **phénomènes de reconnaissance**. Ils sont à la fois :

- des signaux de reconnaissance,
- des récepteurs, notamment de virus comme le virus de l'influenza,
- des marqueurs de différenciation et de cancérisation de certains types de cellules,
- ils servent au masquage de sites antigéniques et sont alors des

signaux d'"anti-reconnaissance" (revue de Varki, 1992).

* En outre, les acides sialiques jouent un rôle dans les phénomènes d'**adhésion cellulaire** :

- des sous-populations de macrophages murins expriment à leur surface un récepteur "lectine-like", la sialoadhésine qui reconnaît sélectivement la structure Neu5Aca2,3Galβ1,3GalNAc et qui semble être impliquée dans des interactions entre les macrophages et d'autres cellules (Crocker et al., 1991).

- la molécule ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1), membre de la famille des sélectines, est un récepteur des cellules endothéliales pour les neutrophiles et les monocytes et est impliquée dans la mobilisation de ces cellules aux sites de lésion tissulaire. Cette molécule d'adhésion ELAM-1 reconnaît les structures sialyl-Lewis^x (S-Le^x) des glycoprotéines et des glycolipides membranaires (Polley et al., 1991).

- les NCAM (neural cell adhesion molecules) sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire présentant des structures N-glycosidiques terminales inhabituelles qui résultent d'une polymérisation en liaison α2,8 de plus d'une cinquantaine de résidus d'acides sialiques (Livingston et al., 1988). Exposées à la surface des cellules neurales, ces molécules permettent les interactions de types homophiles entre ces cellules (Rutishauser et al., 1982, 1988).

* Enfin, ils permettent le masquage de déterminants antigéniques et contrôlent la durée de vie de certains composés dans la circulation sanguine. Ainsi, les globules rouges désialylés après traitement par une sialidase ont une demi-vie qui passe de 120 jours à quelques heures et sont dégradés par les cellules de Kupffer alors que les glycoprotéines

circulantes ayant subit le même traitement sont endocytées et détruites par les hépatocytes.

4 - Sialylation et métastase.

Puisqu'il est maintenant clairement établi que les acides sialiques jouent un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance entre les cellules et le milieu environnant, leur intervention directe dans l'adhésion et la mobilité des cellules normales implique qu'ils vont pouvoir influencer le comportement des cellules tumorales. Ainsi, il est logique de penser que l'augmentation de la sialylation observée au niveau des cellules malignes et tumorales contribue à l'augmentation de la mobilité de ces cellules et à leur capacité invasive et métastatique, et ceci en intervenant notamment dans les étapes importantes de ces mécanismes telles que :

- La libération des cellules tumorales depuis la tumeur primaire consécutive à une perte de reconnaissance avec les cellules environnantes,
- les interactions hétérotypiques permettant notamment le transport des cellules métastasantes dans le sang et leur attachement à l'endothélium vasculaire,
- l'installation et le développement de ces cellules dans un nouvel organe grâce à des interactions spécifiques avec les cellules du tissu cible.

Dans un premier temps, le taux de sialylation des résidus de Gal et de GalNAc terminaux à la surface d'une série de cellules tumorales murines a été effectivement corrélé à la capacité de ces cellules à métastaser au poumon après injection sous-cutanée en système homologue, confirmant le rôle des acides sialiques de la surface cellulaire dans les

métastases des cellules tumorales (Yogeeswaran & Salk, 1981). Les mêmes observations ont été faites par de nombreux laboratoires à partir de cellules de mélanomes (Bosmann et al., 1973; Dobrossy et al., 1981), d'hybridomes (Collard et al., 1986) ou de lymphomes (Altevogt et al., 1983). Ainsi, le traitement de ces cellules par une sialidase induit la perte de leur capacité de métastaser au poumon depuis un site d'injection sous-cutané ou intraveineux (Collard et al., 1986), tout comme il fut démontré que l'inhibition des activités sialyltransférasiques de lignées cellulaires d'adénocarcinome du colon de Souris par un inhibiteur spécifique entraînait une diminution significative de leur capacité à métastaser lorsqu'elles étaient injectées dans une veine de la queue de ces animaux (Kijima-Suda et al., 1986).

Toutefois, le rapport entre la sialylation de surface des cellules tumorales et leur capacité à métastaser n'est pas si simple.

- L'utilisation de concentrations toxiques de lectines végétales telles que la WGA et la RCA permet de sélectionner dans une population de cellules tumorales métastasantes, des variants résistants à faible pouvoir métastatique. Par cette méthode, certains laboratoires ont pu montrer que la diminution du pouvoir métastatique s'accompagnait d'une diminution de la quantité d'acides sialiques liés en $\alpha 2,3$ sur les structures N-glycosidiques, sans que soit modifié toutefois le taux total de sialylation à la surface cellulaire (Finne et al., 1982; Stanley, 1984; Dennis et al., 1984).

- En outre, la glycosylation périphérique de ces structures glycaniques semble être également importante sur les capacités métastatiques des cellules. Le traitement par la sialidase de Vibrio cholerae de variants de mélanomes B16 sélectionnés selon leur capacité à métastaser et à coloniser le poumon ou selon leur capacité à métastaser spontanément

ment depuis un site d'injection sous-cutané a permis à Passaniti et Hart (1988) de montrer qu'aucun des variants métastatiques ne différaient significativement dans le taux de sialylation global de leur surface, mais que leurs différences de capacité à coloniser le poumon dépendait du taux relatif de structures en avant-dernière position susceptibles d'être acceptrices de résidus d'acide sialique (Passanati & Hart, 1988).

- Enfin, d'autres études ont permis de démontrer que les capacités métastasantes de cellules tumorales ou de cellules transformées viralemment résultaient d'une augmentation de l'antennarisation des structures N-glycosidiques en conséquence d'une élévation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V, plutôt que d'une altération de la sialylation de surface de ces cellules (Yamashita et al., 1984, 1985; Dennis et al., 1987, 1989).

Néanmoins, il semble actuellement que les capacités métastatiques des cellules tumorales soient, d'une part, liées à la disparition de structures exprimées à la surface des cellules normales et, d'autre part, à l'expression de structures N-glycosidiques à la fois branchées en β -1,6 et sialylées. L'élévation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V, en augmentant l'antennarisation, augmenterait le nombre de sites de sialylation, mais pourrait également modifier la proportion d'acides sialiques liés en α 2,3 et en α 2,6 (Dennis, 1988).

Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée grâce à l'analyse de glycannes isolés de cellules transformées par transfection d'oncogènes (Dennis et al., 1989; Dennis & Laferté, 1989; Santer et al., 1989; Le Marer et al., 1992)

Tableau IX: Sialyltransférases purifiées.

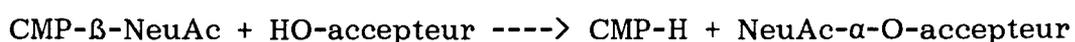
Spécificité	MW (kD)	Source	Références
Gal β 1-4GlcNAc: α 2,3-ST	56	Colostrum de Vache	Paulson <u>et al.</u> , 1977
Gal: α 2,3-ST	49	Glandes sous-maxillaires de Porc Foie de Porc	Sadler <u>et al.</u> , 1979b Conradt <u>et al.</u> , 1988
GalNAc: α 2,6-ST	160	Glandes sous-maxillaires de Porc	Sadler <u>et al.</u> , 1979a
Gal β 1-4GlcNAc: α 2,6-ST	47	Foie de Rat	Weinstein <u>et al.</u> , 1982a
Gal β 1-3/4GlcNAc: α 2,3-ST	56	Foie de Rat	Weinstein <u>et al.</u> , 1982a
Gal β 1-3GlcNAc: α 2,3-ST et α 2,3-SAT(SAT-4)	65	Placenta humain	Joziassse <u>et al.</u> , 1985
Gal β 1-4GalNAc: α 2,3-ST	44	Cerveau de Rat	Gu <u>et al.</u> , 1990
Gal β 1-4GlcNAc: α 2,3-ST (SAT-1)	43	Foie de Rat	Melkerson-Watson et Sweeley, 1991
Gal β 1-4GlcNAc: α 2,6-ST	61,5	Foie humain	Sticher <u>et al.</u> , 1991

Tableau X : Sialyltransférases clonées.

Sialyltransférase (ST)		Taille des transcrits (kb)	Références
Spécificité	n°EC		
Gal β 1-4GlcNAc: α 2,6-ST	2.4.99.1	3,6; 4,3 et 4,7	Weinstein <u>et al.</u> , 1987
Gal β 1-3/4GlcNAc: α 2,3-ST	2.4.99.6	2 et 2,5	Wen <u>at al.</u> , 1992a
Gal β 1-3GalNAc: α 2,3-ST	2.4.99.4	5,7	Gillespie <u>et al.</u> , 1992

II - LES SIALYLTRANSFERASES.

Les sialyltransférases sont des enzymes intervenant dans la glycosylation terminale des glycoprotéines et des glycolipides. Ce sont des enzymes transmembranaires intégrés dans les vésicules golgiennes. Elles catalysent le transfert de résidus d'acide sialique à partir de leur forme activée, le CMP-acide sialique. La réaction peut être schématisée de la façon suivante :



Contrairement aux autres glycosyltransférases, les sialyltransférases ne nécessitent pas la présence de cations bivalents (Mg^{2+} , Mn^{2+}) pour leur activité.

On estime à dix à douze le nombre de sialyltransférases différentes nécessaires à la synthèse des séquences oligosaccharidiques sialylées connues. Chacune d'entre elles peut être distinguée enzymatiquement par sa spécificité vis-à-vis de la séquence acceptrice et vis-à-vis de la liaison formée.

Comme toutes les enzymes intervenant dans la glycosylation terminale des glycoconjugués, les sialyltransférases sont l'objet de nombreuses études. Si quelques uns de ces enzymes ont pu être purifiés chez les mammifères (Tab.IX, p.78), seules trois d'entre eux ont été clonés (Tab.X, p.78), et deux d'entre eux n'ayant d'ailleurs été clonés que très récemment. Ainsi, lorsque nous tenterons, dans les pages suivantes, de décrire les propriétés des sialyltransférases, nous nous attacherons essentiellement à la description de ces trois enzymes, et plus particulièrement de la β -galactoside α 2,6-sialyltransférase (α 2,6ST(N)) qui, ayant été l'une des premières glycosyltransférases clonées, est la sialyltransférase la plus étudiée et actuellement la mieux connue.

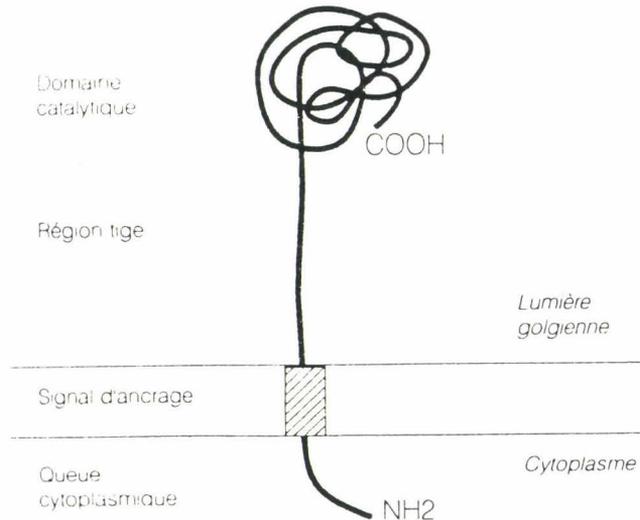


Figure 17A : Topologie commune aux glycosyltransférases clonées.

Les séquences en acides aminés des glycosyltransférases clonées intervenant dans la glycosylation terminale des glycanes permettent de penser que ces enzymes ont une topologie caractéristique dans l'appareil de Golgi : un court domaine N-terminal situé dans le cytoplasme, un domaine transmembranaire servant de signal d'ancrage, un domaine "tige" étendu et un domaine catalytique C-terminal majeur orienté dans la lumière des vésicules golgiennes (Paulson & Colley, 1989).

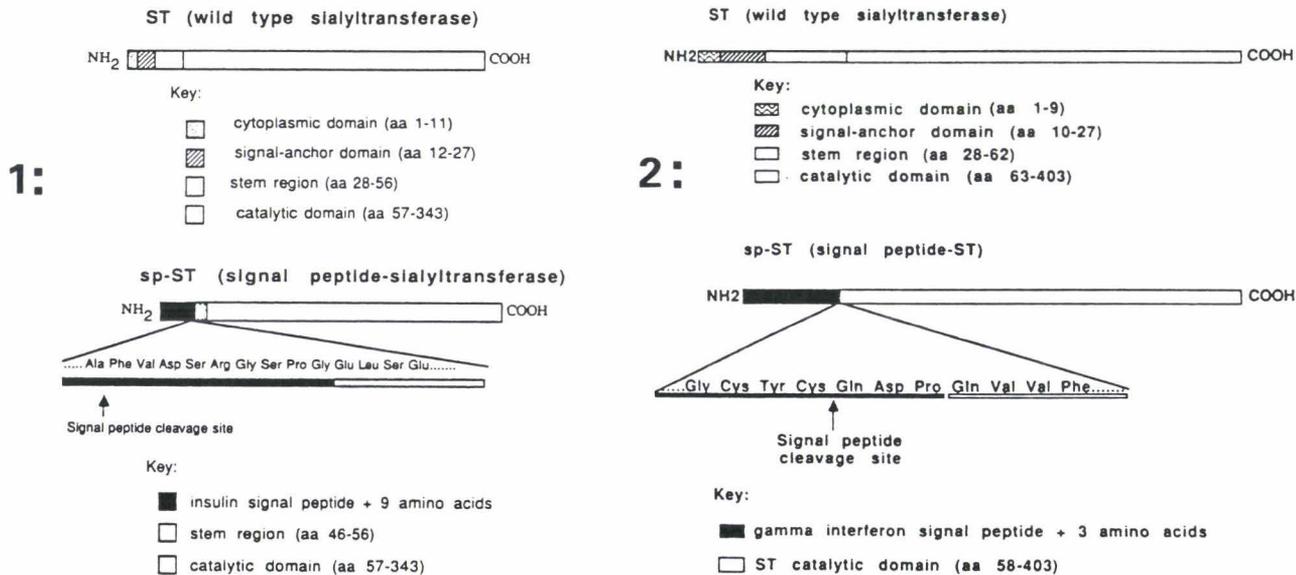


Figure 17B : Organisation en domaines de l' α 2,6ST(N) (1) et de l' α 2,3ST(O) (2).

L'expression de protéines de fusion dans lesquelles les domaines N-terminaux de l' α 2,6ST(N) et de l' α 2,3ST(O) sont respectivement remplacés par le peptide signal clivable de l'insuline (1) et de l'interféron gamma (2), induit la production d'enzymes solubles catalytiquement actifs (d'après Colley *et al.*, 1989, Gillespie *et al.*, 1992).

A - Structure et localisation des sialyltransférases.

1 - Organisation en domaines.

La séquence protéique des trois sialyltransférases clonées, déduite de leur séquence nucléotidique, montre qu'elles partagent avec les autres glycosyltransférases golgiennes dont la séquence est connue à ce jour, une même organisation en domaine. En effet, elles présentent une structure transmembranaire de type II (Fig.17A, p.80), les glycosyltransférases sont constituées :

- d'un court segment N-terminal (4-41 acides aminés) localisé dans le cytoplasme,
- d'un domaine hydrophobe servant de signal d'ancrage dans la membrane (16-25 acides aminés),
- d'un domaine C-terminal catalytique orienté dans la lumière des vésicules golgiennes (316-418 acides aminés), généralement porteur de structures glycaniques (revue de Schachter, 1991; Shaper, 1992).

Le **signal d'ancrage** dans la membrane est en fait un signal de "non-clivage" de cette région et permet d'orienter le domaine catalytique de l'enzyme dans la lumière des vésicules golgiennes (Wickner & Lodish, 1985).

Le **domaine luminal** est en fait composé du domaine catalytique lui-même de forme globulaire relié au domaine transmembranaire par une longue séquence flexible appelée "région tige" (Fig.17A, p.80). Cette région permettrait au domaine catalytique d'être mobile afin de glycosyler à la fois des glycoprotéines liées à la membrane et des protéines solubles transitant à travers l'appareil de Golgi (Paulson & Colley, 1989). L'organisation en domaine de l' α 2,6ST(N) et de l' α 2,3ST(O) sont données dans la figure 17B (p.80).

2 - Localisation des sialyltransférases.

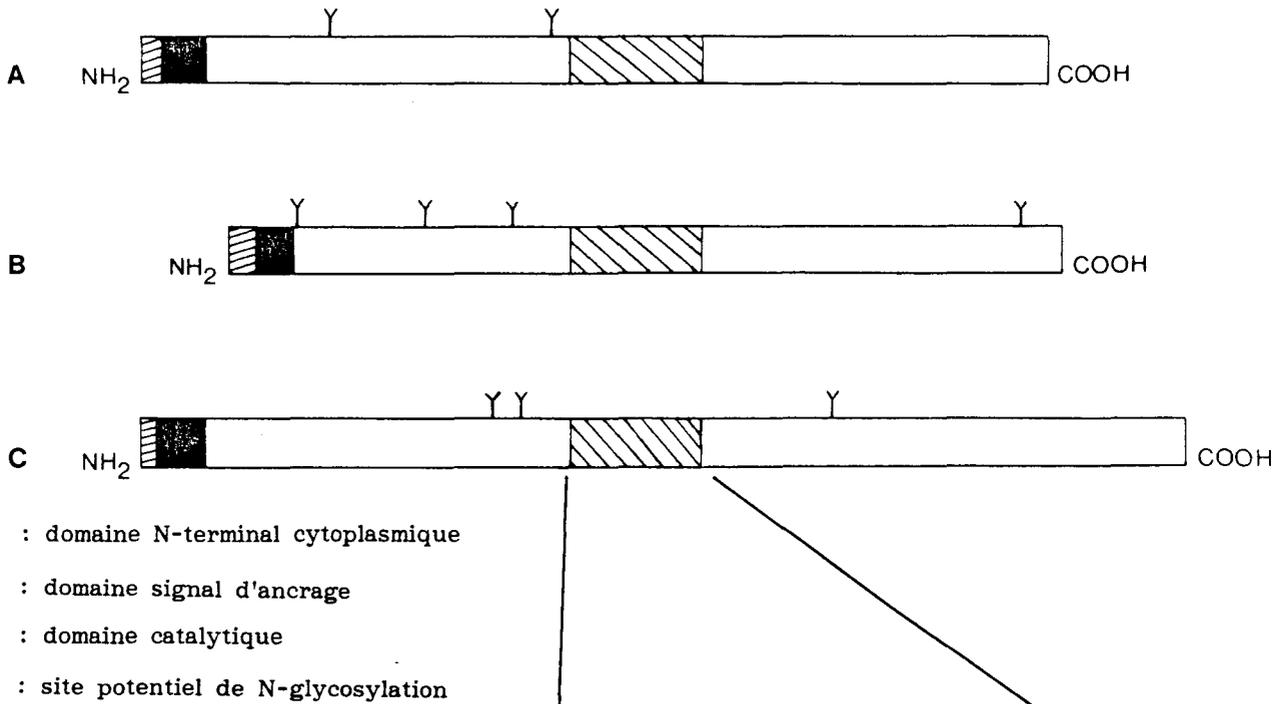
Intervenant dans la phase finale de la glycosylation des glyco-conjugués, les sialyltransférases sont localisées dans le trans-Golgi et dans le réseau trans-golgien (Roth et al., 1985; Taatjes et al., 1988). Néanmoins, une répartition plus diffuse de l' α 2,6-sialyltransférase à travers les différentes vésicules golgiennes a été observée par microscopie électronique des entérocytes (Roth et al., 1986).

L'ancrage des sialyltransférases dans la membrane golgienne s'effectue par le domaine N-terminal. Lorsque celui-ci est remplacé par un peptide signal clivable tel que le peptide signal de l'interféron gamma ou de l'insuline (Fig.17B, p.80), l'enzyme est alors sécrété sous sa forme active dans le milieu extra-cellulaire (Colley et al., 1989). Il a été démontré plus récemment que seuls les 44 premiers acides aminés dans le cas de l' α 2,6ST(N) sont suffisants pour induire la rétention de l'enzyme dans la membrane golgienne mais que cette action est augmentée par la présence des séquences luminales et cytoplasmiques environnantes (Munro, 1991).

Toutefois, des formes solubles et catalytiquement actives de cette enzyme ont été trouvées dans des milieux de sécrétion et dans des liquides biologiques tels que le lait, le colostrum (Paulson et al., 1977) et le sérum (Kaplan et al., 1983; Lammers & Jamieson, 1988) et les taux sériques de ces enzymes augmentent dans certains cas pathologiques ou dans les cas d'inflammation (Lammers & Jamieson, 1989). On a longtemps pensé que ces formes solubles de l' α 2,6ST(N) résultaient d'une dégradation protéolytique accidentelle de la forme membranaire par des protéases endogènes présentes dans les vésicules golgiennes mais il s'avère en fait, que cette libération s'effectue depuis les hépatocytes par coupure de la séquence protéique au niveau de la région "tige" par une

Figure 18 : Homologie de séquence des sialyltransférases clonées.

Les trois sialyltransférases clonées sont la Gal β 1,3/4GlcNAc α 2,3-sialyltransférase de Rat (α 2,3ST(N/O)) (A), la Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransférase porcine (α 2,3ST(O)) (B) et la Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-sialyltransférase de Rat (α 2,6ST(N)) (C).



▨ : domaine N-terminal cytoplasmique
 ■ : domaine signal d'ancrage
 □ : domaine catalytique
 Y : site potentiel de N-glycosylation

ST3N	156	Lys	Arg	Arg	Cys	Ile	Ile	Val	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Lys	Ser	172
ST3O	142	Lys	Arg	Arg	Cys	Ala	Val	Val	Val	Asn	Ser	Gly	Asn	Leu	Lys	Val	Ser	Tyr	158
ST6N	178	Tyr	Gly	Arg	Cys	Ala	Val	Val	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Asn	Ser	194
ST3N	173	Leu	Gly	Ser	Arg	Ile	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ile	Val	Leu	Arg	Leu	Asn	Ser	Ala	189
ST3O	159	Tyr	Gly	Pro	Gln	Ile	Asp	Ser	Ile	Asp	Ile	Val	Leu	Arg	Met	Asn	Lys	Ala	175
ST6N	195	Leu	Gly	Arg	Glu	Ile	Arg	Asn	Ile	Arg	Ala	Val	Leu	Arg	Phe	Asn	Gly	Val	211
ST3N	190	Tyr	Val	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Ile	196	
ST3O	176	Phe	Thr	Leu	Gly	Phe	Glu	Val	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Thr	His	His	Ile	192	
ST6N	212	Leu	Thr	Arg	Asp	Ile	Arg	Val	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Thr	Ile	Asn	Leu	228	
ST3N	207	Thr	Tyr	Phe	Glu													210	
ST3O	193	Val	Tyr	Phe	Glu													196	
ST6N	229	Met	Asn	Ser	Gln													232	

Région conservée entre les trois sialyltransférases.

Cette région consiste en une séquence de 55 acides aminés. Les acides aminés identiques sont encadrés (d'après Wen et al., 1992a).

protéase spécifique homologue à la cathepsine D qui est notamment induite en réponse à l'inflammation (Lammers & Jamieson, 1989).

3 - Homologie de séquence des sialyltransférases.

La comparaison des structures primaires des trois sialyltransférases clonées (Weinstein et al., 1987; Wen et al., 1992a; Gillespie et al., 1992) a permis de révéler que ces enzymes, contrairement aux autres glycosyltransférases clonées, ne présentaient pas d'homologie significative entre eux (Fig.18, p.83) en dehors d'une seule région d'homologie de 55 résidus d'acide aminé localisée entre les résidus :

- 156 et 210 de l' α 2,3ST(N/O)
- 142 et 196 de l' α 2,3ST(O)
- 178 et 232 de l' α 2,6ST(N)

Dans cette séquence qui ne représente qu'environ 15% de la séquence totale de ces sialyltransférases, dans les 58% des acides aminés qui sont conservés entre les trois enzymes, 42% sont identiques. En comparant les enzymes deux à deux, on observe qu'il existe dans cette région :

- 53% d'identité (29/55 acides aminés) entre l' α 2,6ST(N) et l' α 2,3ST(O),
- 45% d'identité (25/55 acides aminés) entre l' α 2,3ST(N/O) et l' α 2,6ST(N)
- et 56% d'identité (31/55 acides aminés) entre l' α 2,3ST(N/O) et l' α 2,3ST(O), laissant à penser que ces trois enzymes dérivent en partie d'un gène commun.

Du fait que cette séquence est située vers le milieu du domaine catalytique des trois sialyltransférases (Fig.18, p.83), il semblerait que cette structure conservée soit nécessaire à leur activité enzymatique. En outre, cette séquence n'ayant pas été retrouvée dans les autres

protéines de la "GeneBank", il est logique de penser qu'elle soit spécifique à la famille des gènes des sialyltransférases. Toutefois, la signification fonctionnelle de cette séquence d'homologie n'est pas évidente. Puisque ces enzymes transfèrent toutes trois de l'acide sialique à partir du CMP-NeuAc sur un résidu de galactose terminal, il est aussi possible que cette région fasse partie du site de fixation des substrats.

B - Expression et spécificité des sialyltransférases.

1 - Spécificité.

Les sialyltransférases présentent une forte spécificité vis-à-vis de la structure acceptrice et vis-à-vis du type de liaison formée. Ainsi, selon la théorie "un gène, un enzyme" (Schachter & Roden, 1973), il existerait une sialyltransférase pour chaque type de liaison formée ($\alpha 2,3$; $\alpha 2,4$; $\alpha 2,6$; $\alpha 2,8$ et $\alpha 2,9$) et pour chaque monosaccharide terminal accepteur (Gal, GalNAc, GlcNAc et NeuAc). Les différentes sialyltransférases pourraient donc être classées en différents groupes :

- Gal: $\alpha 2,3$ -ST; Gal: $\alpha 2,4$ -ST; Gal: $\alpha 2,6$ -ST
- GalNAc: $\alpha 2,6$ -ST
- GlcNAc: $\alpha 2,4$ -ST; GlcNAc: $\alpha 2,6$ -ST
- NeuAc: $\alpha 2,8$ -ST et NeuAc: $\alpha 2,9$ -ST.

Toutefois, la spécificité des sialyltransférases est encore plus étroite car il peut exister plusieurs enzymes reconnaissant le même monosaccharide terminal et possédant la même spécificité de liaison mais agissant sur des glycanes de type différent. Ainsi, dans le groupe des Gal: $\alpha 2,3$ -ST, on peut distinguer :

Tableau XI : Spécificité des sialyltransférases permettant la sialylation des O- et des N-glycosylprotéines.

Enzyme	n°EC	Liaison catalysée
$\alpha 2,6$ ST(N)	2.4.99.1	NeuAc ($\alpha 2-6$)Gal ($\beta 1-4$)GlcNAc
$\alpha 2,3$ ST(N/O)	2.4.99.6	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal ($\beta 1-3$)GlcNAc NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal ($\beta 1-4$)GlcNAc
$\alpha 2,3$ ST(N) (II)	-----	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal ($\beta 1-4$)GlcNAc
$\alpha 2,3$ ST(O)	2.4.99.4	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal ($\beta 1-3$)GalNAc
$\alpha 2,6$ ST(O) I	2.4.99.3	NeuAc ($\alpha 2-6$)GalNAc Gal ($\beta 1-3$)GalNAc / NeuAc ($\alpha 2-6$) Fuc ($\alpha 1-2$)Gal ($\beta 1-3$)GalNAc / NeuAc ($\alpha 2-6$)
$\alpha 2-6$ ST(O) II	2.4.99.7	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal ($\beta 1-3$)GalNAc / NeuAc ($\alpha 2-6$)

- la β -galactoside : α 2,3-ST (EC 2.4.99.6) qui transfère un résidu d'acide sialique sur le galactose en position terminale du motif Gal β 1-3/4GlcNAc β -R des N- et des O-glycannes,

- la β -galactoside : α 2,3-ST (EC 2.4.99.4) qui reconnaît quant à elle, les structures de type I Gal β 1-3GalNAc α -R des O-glycannes,

- la β -galactoside α 2,3-ST (II) du placenta humain qui reconnaît les structures Gal β 1-4GlcNAc-R des N-glycosylprotéines (Nemansky & van den Eijnden, 1993),

- et la β -galactoside : α 2,3-ST (EC 2.4.99.2) qui reconnaît les structures Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-Cer des glycolipides.

De même, l'affinité de certaines enzymes dépend également de l'aglycone. Bergh & van den Eijnden (1983) ont pu montrer que la GalNAc : α 2,6-ST II des O-glycannes (EC 2.4.99.7), extraite de microsomes de foie de Veau foetal reconnaissait les structures Neu5Ac(α 2-3)-Gal(β 1-3)GalNAc- greffées sur une protéine ou sur le para-nitrophénol (pNP) alors que la GalNAc : α 2,6-ST I des O-glycannes (EC 2.4.99.3), extraite de microsomes de glandes sous-maxillaires ovines ou porcines, reconnaissait les structures Gal(β 1-3)GalNAc- et GalNAc- lorsqu'elles étaient greffées sur une protéine mais ne transférait pas l'acide sialique quand ces structures étaient liées au pNP.

Enfin, il a pu être montré que l'activité de différentes sialyltransférases variait fortement selon la nature de l'acide sialique transféré sur le substrat. Par exemple, seule l' α 2,6ST(N) de foie de Rat peut sialyler une asialo-glycoprotéine avec un acide sialique substitué sur le carbone 9 (Gross et al., 1989).

Les spécificités d'action des différentes sialyltransférases responsables de la sialylation des glycoprotéines sont résumées dans le tableau XI (p.86).

2 - Expression des sialyltransférases en fonction des espèces.

Les sialyltransférases présentent un spectre d'action et d'expression variable en fonction des espèces. Un exemple peut être donné par les cellules CHO (Chenese Hamster Ovary) qui n'expriment pas le gène de la β -galactoside α 2,6-sialyltransférase (α 2,6-ST). Ainsi, toutes les structures N-glycosidiques de ces cellules ne peuvent être que sialylées en α 2,3 (Lee et al., 1989).

3 - Expression tissulaire.

La comparaison de l'activité enzymatique de différentes sialyltransférases dans les tissus de Rat (Paulson et al., 1989), ainsi que la comparaison du taux d'ARNm codant pour ces enzymes (Wen et al., 1992a; Gillespie et al., 1992), ont permis de montrer que :

- L' α 2,3ST(N/O) n'est pratiquement pas exprimée dans le coeur, la rate, les glandes sous-maxillaires et l'intestin mais est active dans le tissu hépatique, les ovaires, les poumons et les reins.
- L' α 2,3ST(O) est faiblement exprimée dans le cerveau, les testicules, les reins et le coeur mais est active dans les poumons, le colon, le foie et les glandes salivaires.

III - REGULATION DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES : CAS DE LA β -GALACTOSIDE: α 2,6-SIALYLTRANSFERASE.

La β -galactoside α 2,6-sialyltransférase (α 2,6ST(N), E.C. 2.4.99.1) qui catalyse le transfert de l'acide sialique en liaison α 2,6 sur les résidus de N-acétyllactosamine en position terminale non-réductrice a été caractérisée et purifiée à partir du foie de Rat depuis 1982 (Tab.IX, p.78) et clonée chez le même animal en 1987 (Tab.X, p.78). Cet enzyme

est la sialyltransférase la plus étudiée et dont la régulation est la mieux connue si tant est que l'on connaisse les systèmes régulant les activités glycosyltransférasiques.

En outre, cet enzyme a également été caractérisé et purifié à partir du foie humain (Sticher et al., 1991), partiellement cloné à partir d'une banque génomique de glande sous-maxillaire humaine (Lance et al., 1989) et entièrement cloné à partir du placenta humain (Grundmann et al., 1990). Les séquences codantes de ces clones présentent respectivement une homologie de l'ordre de 86 et 87,6% avec l'enzyme hépatique de Rat. Enfin, le gène de cet enzyme humain a été localisé récemment sur le bras long du chromosome 3 (q21-q28) (Wang et al., 1993).

A - Régulation de l' α 2,6ST(N).

1 - Régulation par la structure de l'accepteur.

L' α 2,6-ST(N) est exprimée de façon ubiquiste dans l'appareil de Golgi des cellules de tous les tissus de Rat et en particulier de façon remarquablement élevée dans le foie (Paulson et al., 1989) ce qui a d'ailleurs facilité l'étude de son expression.

Cet enzyme est spécifique du disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc situé en position terminale des N-glycannes. Ainsi, si le taux relatif de transfert d'acide sialique par cet enzyme purifié du foie de Rat est de 1 pour la structure Gal(β 1-4)GlcNAc ($K_m=1,62$ mM), il est de 0,01 pour la structure Gal(β 1-4)Glc ($K_m=129$ mM), alors que les structures Gal(β 1-6)GlcNAc et Gal(β 1-3)GlcNAc ne sont pas acceptrices. En outre, il ne reconnaît pas les structures suivantes : Gal(β 1-6)GalNAc, Gal(β 1-3)GalNAc, GlcNAc-R (R=oligosaccharide), Gal(β 1-3)GalNAc-Ser/Thr, GalNAc-Ser/Thr ou toute autre structure oligosaccharidique

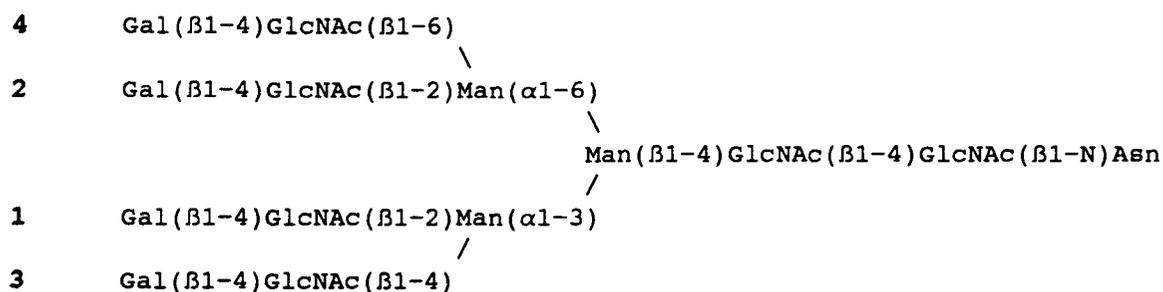


Figure 19 : Spécificité de la β-D-galactoside α-2,6-sialyltransférase (α2,6ST(N)) pour chacune des branches d'une structure N-acétyllactosaminique tétra-antennée utilisée comme accepteur (Joziassé et al., 1987).

Les différents sites de sialylation sont classés par ordre décroissant de leur affinité pour l'α2,6ST(N).

lié O-glycosidiquement à une glycoprotéine (Weinstein et al., 1982a,b).

Joziase et al. (1987) ont également démontré, comme le montre la figure 19 (p.90), que l' α 2,6ST(N) agit préférentiellement sur la branche 1 d'une structure antennée, puis reconnaît avec une affinité plus faible l'antenne 2. Dans une structure tri- ou tétra-antennée, elle ne reconnaît qu'avec une très faible affinité la branche 3 mais ne transfère pratiquement jamais d'acide sialique sur la branche 4 qui présente une trop grande mobilité dans l'espace due au branchement en α 1-6.

Néanmoins, cette spécificité très étroite de la β -galactosidase α 2,6-ST semble être remise en question depuis qu'un groupe de chercheurs, ayant découvert des structures NeuAc(α 2-6)Man(β 1-4)GlcNAc dans les urines de patients atteints de β -mannosidose, ont pu montrer que cet enzyme acceptait in vitro les structures Man(β 1-4)GlcNAc et Man(β 1-4)-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc comme substrat (van Pelt et al., 1989). De même, il fut récemment démontré que la forme soluble de cet enzyme, purifiée du colostrum bovin était capable, contre toute attente, de sialyler en α 2,6 le disaccharide GalNAc(β 1-4)GlcNAc pour former la structure trisaccharidique NeuAc(α 2,6)GalNAc(β 1-4)GlcNAc fréquemment rencontrée sur nombre de N-glycosylprotéines du lait de Vache (Nemansky & van den Eijnden, 1992). Des expériences de compétition entre les disaccharides Gal β 1-4GlcNAc et GalNAc β 1-4GlcNAc suggèrent que ces deux substrats sont reconnus par le même site actif de l'enzyme (Nemansky & van den Eijnden, 1992). Il apparaît donc que l'activité de l' α 2,6ST(N) soit en partie régulée par la structure même de l'accepteur.

2 - Régulation tissulaire de l'expression de l' α 2,6-sialyltransférase.

Des analyses par northern blot des ARNm codant pour l' α 2,6ST(N) dans différents tissus de Rat, ont permis de révéler que l'ADNc correspondant à la séquence codante de l'enzyme cloné à partir du foie de Rat, s'hybridait avec des ARNm de différentes tailles de manière différentielle selon les tissus (Paulson et al., 1989; O'Hanlon et al., 1989).

Ainsi :

- un ARNm de 4,3 kb a pu être détecté en très forte quantité uniquement dans le tissu hépatique,
- un ARNm de 4,7 kb a été visualisé dans les autres tissus tels que la rate, l'ovaire, le coeur, le rein et le cerveau,
- et un ARNm de 3,6 kb s'est révélé être la forme prédominante des transcrits du rein.

En outre, l'analyse quantitative de ces ARNm dans les différents tissus a permis de mettre en évidence un spectre d'expression tissulaire des ARN messagers avec le plus faible taux observé dans le cerveau, des taux intermédiaires dans l'ovaire, la rate, le rein et le poumon et un taux de l'ordre de 10 à 50 fois plus élevé dans le foie. Le même type de résultats, obtenus en comparant les activités sialyltransférasiques (Paulson et al., 1989), suggère que la variation de l'activité spécifique de l' α 2,6ST(N) (de plus de 100 fois, avec la plus forte activité détectée dans le foie et la plus faible dans le cerveau et le coeur) résulte d'une variation du taux d'expression des ARNm par un contrôle du taux de transcription du gène codant pour l'enzyme.

Néanmoins, l'utilisation de sondes correspondant à différentes régions de l'ADNc de l'enzyme clonée à partir du foie de Rat, a permis de révéler que les ARNm de 4,3 et de 4,7 kb étaient fortement homologues sur toute leur longueur alors qu'il manquait au transcrit rénal de 3,6 kb la région 5' correspondant à 45% de la séquence codante N-terminale (Paulson et al., 1989), prédisant ainsi une protéine ne

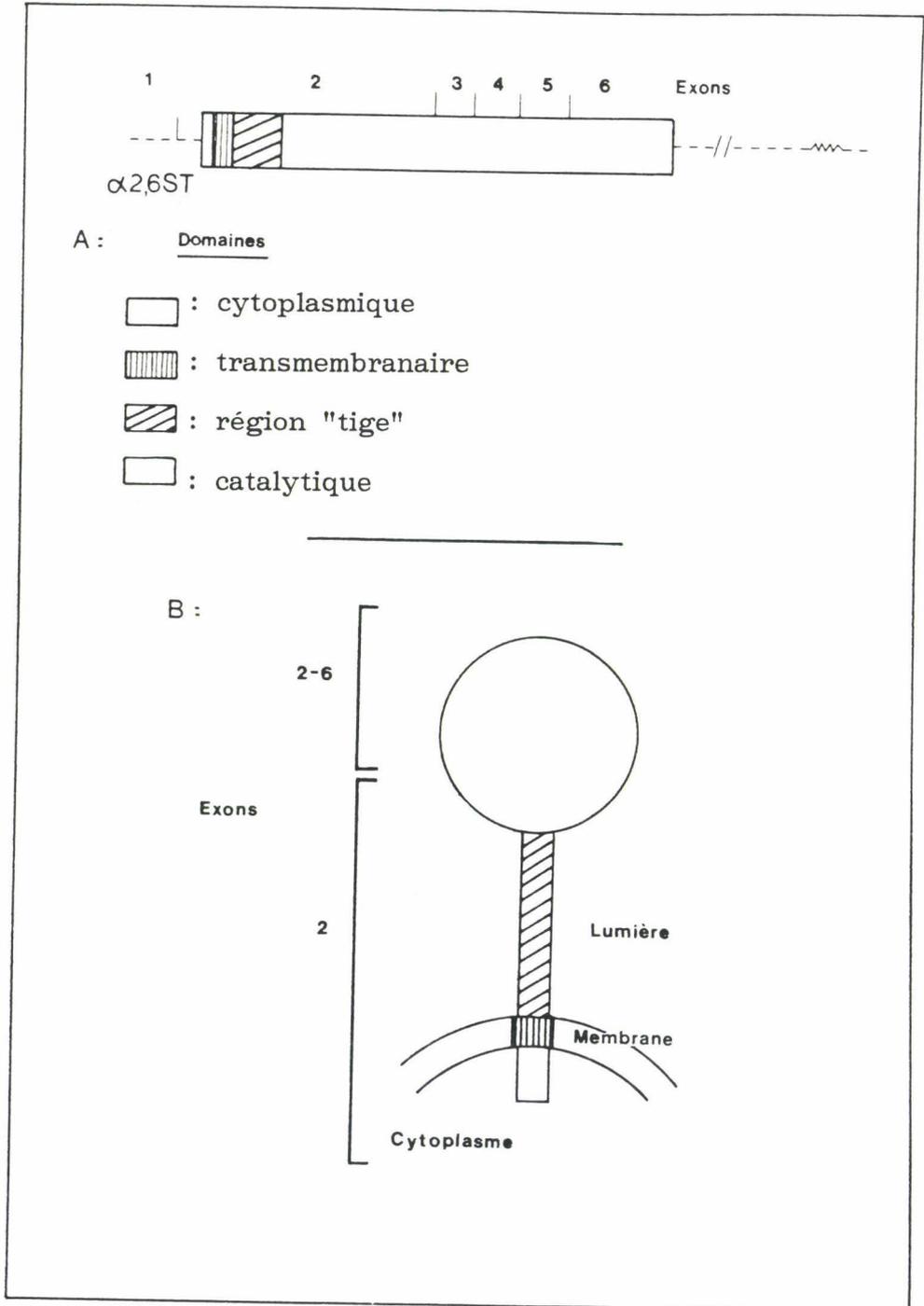


Figure 20 : Corrélation entre les domaines de la protéine et l'organisation en exons de l' $\alpha 2,6ST(N)$.

En **A** est représenté schématiquement le gène de l' $\alpha 2,6ST(N)$, les rectangles représentant la séquence codante pour la protéine, les traits verticaux démarquant les limites de chaque exon. En **B** est représentée la topologie de l'enzyme dans la membrane golgienne avec les exons contenant chacun des domaines (d'après Svensson *et al.*, 1990).

correspondant qu'à 42% de la partie C-terminale du polypeptide de l' $\alpha 2,6$ ST(N) (O'Hanlon et al., 1989).

Ces observations semblent indiquer que l'expression différentielle, qualitative et quantitative de l' $\alpha 2,6$ ST(N) dans les différents tissus de Rat, puisse être régulée à la fois par une variation du taux de transcription du gène et par un des mécanismes qui permettent l'obtention de différents transcrits à partir d'un seul gène, tels que l'utilisation :

- de différents sites d'initiation de transcription,
- de différents sites de polyadénylation,
- de différents mécanismes d'épissage du transcrit primaire
- ou d'une combinaison entre ces différents mécanismes (Leff et al., 1986; Breitart et al., 1987).

Afin d'établir l'organisation du gène de l' $\alpha 2,6$ ST(N) et de comprendre la régulation tissulaire de son expression, il était nécessaire de caractériser chacun des trois ARNm ainsi que les séquences génomiques correspondantes.

B - Organisation génomique et régulation transcriptionnelle du gène de l' $\alpha 2,6$ ST(N).

1 - Structure du gène codant pour l' $\alpha 2,6$ ST(N) de Rat.

* Le gène codant pour l'ARNm du foie de Rat de 4,3 kb a été le premier à être analysé (Svensson et al., 1990; Wang et al., 1990a). Il s'est révélé correspondre à une séquence d'ADN génomique de 40 kb contenant 6 exons (Fig.20, p.93) :

- l'exon I contient l'information pour la séquence 5' non traduite,
- l'exon II contient l'information pour la séquence N-terminale

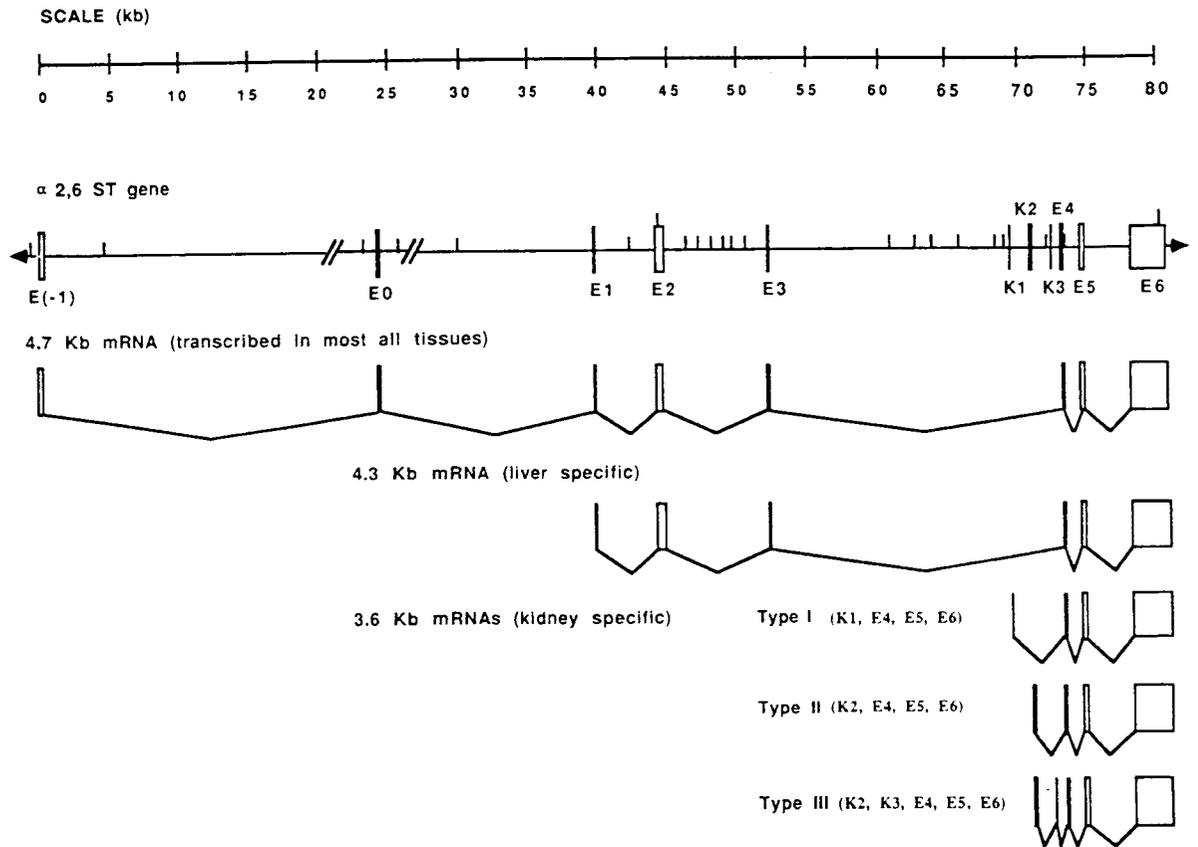


Figure 21 : Organisation du gène de l' α -2,6-sialyltransférase (α 2,6ST(N)) qui correspond à une séquence d'ADN génomique de 80 kb contenant 11 exons. Les mécanismes d'épissage pour chacun des ARNm sont décrits dans le texte (d'après Wen *et al.*, 1992b).

cytoplasmique de la protéine ainsi que pour le domaine transmembranaire et la région "tige",

- les exons II, III, IV, V et VI codent pour le site catalytique de l'enzyme

- et enfin, l'exon VI contient également le signal de fin de traduction ainsi que toute la région 3' non traduite (2,8 kb).

* Alors que Paulson et al. (1989) avaient préalablement démontré que les ARNm de 4,3 et de 4,7 kb étaient homologues sur toute leur longueur, indiquant donc qu'ils codent tous deux pour une seule et même protéine, la comparaison des séquences nucléotidiques de ces deux transcrits a permis de montrer qu'ils ne diffèrent, en fait, que dans l'extrémité 5' non traduite. Ayant cloné l'ADNc correspondant à cet ARNm de 4,7 kb, Wen et al. (1992b) ont pu montrer que ce messager contenait effectivement les 6 exons du messager hépatique mais également 2 exons supplémentaires, exon E(0) et exon E(-1) (Fig.21, p.95) à son extrémité 5'. L'existence de ces 2 exons supplémentaires situés respectivement à 15 et 40 kb en amont du site d'initiation de transcription de l'ARNm hépatique, suggère qu'un promoteur différent est utilisé pour la transcription de l'ARNm de 4,7 kb. Une question peut donc être posée : pourquoi deux promoteurs sont-ils nécessaires pour générer deux ARNm codant pour une même protéine ?

Deux types d'observations permettent de répondre à cette question : d'une part, les analyses comparatives des différents transcrits de l' $\alpha_2,6ST(N)$ qui montrent que l'ARNm de 4,7 kb est constitutivement exprimé dans tous les tissus de Rat alors que l'ARNm de 4,3 kb n'est exprimé que dans le foie (Paulson et al., 1989, O'Hanlon et al., 1989). D'autre part, le fait que de l'activité l' $\alpha_2,6ST(N)$ soit augmentée de façon spécifique dans le foie au cours de la réponse inflammatoire

(Lammers & Jamieson, 1989). Ces deux observations soutendent une régulation transcriptionnelle distincte de ces deux transcrits dépendante de l'utilisation de deux promoteurs distincts et séparés physiquement sur le gène de l'enzyme.

* La bande de 3,6 kb observée préalablement en northern blot (Paulson et al., 1989; O'Hanlon et al., 1989) correspond en fait à plusieurs transcrits qui diffèrent dans leur extrémité 5' et qui présentent une homologie avec une partie des messagers de 4,3 kb et de 4,7 kb comprenant une partie de la séquence codante pour l'enzyme et la séquence 3' non traduite (Wen et al., 1992b). En se reportant à la figure 21 (p.95), on peut constater que la bande de 3,6 kb observée dans le rein, correspond à trois types d'ARNm qui sont exprimés en quantité variable, le type I étant le plus fortement exprimé, le type III n'ayant en fait pu être détecté que lors du clonage de l'ADNc (Wen et al., 1992b).

Les ARNm de type II et III codent pour des protéines dont les fonctions potentielles ne sont pas évidentes. Des transfectants de cellules CHO (dont le type sauvage n'exprime pas l' α 2,6ST(N)) contenant les polypeptides codés par ces deux transcrits, ne présentent pas d'acide sialique lié en α 2,6 à leur surface, à l'inverse de transfectants contenant le polypeptide codé par l'ARNm de 4,7 kb (O'Hanlon & Lau, 1992). Il semble donc que les 171 acides aminés communs entre ces enzymes ne soient pas suffisants à l'activité catalytique de l' α 2,6ST(N). L'utilisation d'un promoteur alternatif pour générer ces deux transcrits induit une délétion des 232 acides aminés N-terminaux présents dans les formes lourdes et correspondant à la fois au domaine N-terminal cytoplasmique, au domaine transmembranaire et à une partie du domaine catalytique comprenant le domaine "tige". Ainsi, si les polypeptides

codés par ces deux ARNm de 3,6 kb sont effectivement catalytiquement actifs, il est possible qu'ils ne soient pas correctement orientés dans l'espace pour sialyler les glycoprotéines naissantes, et ceci du fait de la délétion des domaines fonctionnels N-terminaux (O'Hanlon & Lau, 1992).

Wang et al. (1990a) ont pu identifier et localiser le site d'initiation de la transcription de ces deux ARNm entre les exons K1 et K2 du gène de l' α 2,6ST(N) (Fig.21, p.95). Or, il est impossible que ce promoteur soit responsable de l'expression de l'ARNm de type I, puisque cet exon K1, présent dans ce transcrit, se situe en amont de ce promoteur. Il apparaît donc, qu'en plus du mécanisme d'épissage différentiel d'un transcrit primaire nécessaire à l'apparition des ARNm de types II et III, deux promoteurs alternatifs sont nécessaires pour générer les ARNm de 3,6 kb spécifiques du rein à partir du gène de l' α 2,6ST(N).

2 - Organisation génomique de l' α 2,6ST(N) humaine.

On ne possède que très peu d'informations concernant le gène de l' α 2,6ST(N) humaine mais, néanmoins, des analyses comparatives entre les séquences génomiques de l' α 2,6ST(N) humaine et de Rat (Wang et al., 1993) ont permis de mettre en évidence d'une part, une conservation précise des frontières entre les exons et les introns dans la séquence codante des deux enzymes et, d'autre part, une forte similitude entre les deux espèces, dans une partie de la région 5' terminale non traduite.

En outre, comme chez le Rat, l' α 2,6ST(N) semble subir une régulation transcriptionnelle en fonction des tissus puisque l'étude de cellules de lignées B a révélé que trois exons situés en amont de la séquence codante de l' α 2,6ST(N) apparaissent de manière alternative dans deux ARNm distincts alors qu'aucun de ces exons n'a pu être mis en évidence

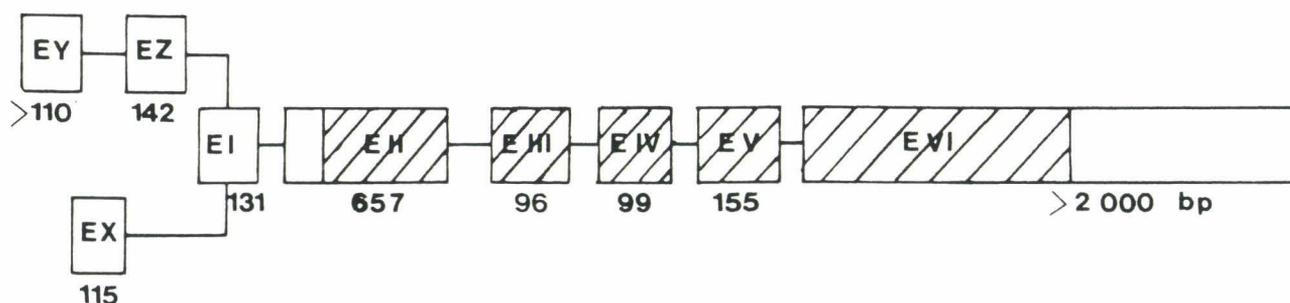


Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation génomique de l' α 2,6ST(N) humaine.

Les zones hachurées schématisent les régions codantes pour la protéine (d'après Wang et al., 1993).

dans un troisième isotype de transcrit exprimé dans les cellules hépatomateuses HepG2. En effet, Wang et al. (1993) ont pu montrer que dans les lignées de cellules de type lymphoblaste-B, le taux de base d'ARNm de l'enzyme est maintenu par l'expression d'un isotype de transcrit contenant les exons (Y+Z), alors qu'un ARNm de plus petite taille ne contenant que l'exon (X) et non pas les exons (Y+Z) est quant à lui synthétisé en quantité plus importante dans les cellules présentant un phénotype de cellules B matures (Fig.22, p.99).

Ainsi, la similitude entre les exons (Y+Z) (qui avec l'exon I et une partie de l'exon II, forment l'extrémité 5' non traduite de l'ARNm humain le plus lourd) avec les exons E(-I) et EO de Rat, suggère que ce messager est l'homologue humain de l'ARNm de 4,7 kb exprimé dans la quasi-totalité des tissus de Rat. Cette notion est d'ailleurs confirmée par le fait que ce transcrit, dont l'ADNc a été initialement isolé à partir du placenta (Grundmann et al., 1990), est présent dans un grand nombre de cellules et de tissus humains.

Enfin, il apparaît que l'utilisation alternative de ces exons (X) et (Y+Z), qui ne sont pas localisés sur le même ADNc (Fig.22, p.99), permette comme chez le Rat, une régulation à la fois quantitative et qualitative de la transcription des isotypes d'ARNm codant pour l' $\alpha_2,6$ ST(N) et ceci en fonction du type cellulaire et tissulaire.

3 - Régulation transcriptionnelle de la forme hépatique de l' $\alpha_2,6$ ST(N) de Rat.

Du fait que l' $\alpha_2,6$ ST(N) présente une activité enzymatique ainsi qu'un taux d'ARNm nettement plus important dans le foie que dans les autres organes de Rat, il était important d'analyser le promoteur de cet enzyme hépatique afin de tenter de comprendre les mécanismes qui régissent cette induction spécifique d'un type tissulaire. L'analyse de

ce promoteur a permis de révéler que la séquence nucléotidique située en amont du site d'initiation de transcription, outre des sites de fixation pour les facteurs de transcription AP-1 et AP-2, contenait également des sites consensus de fixation pour des facteurs spécifiques du tissu hépatique (Svensson et al., 1992). Il est donc logique de penser que la liaison des facteurs HNF-1 (hepatocyte nuclear factor), DBP (D-binding protein) et LAP (liver enriched transcriptional activator protein) sur la séquence génomique de l'enzyme entre l'exon E0 et l'exon I, soit responsable de l'induction transcriptionnelle de l' $\alpha_2,6$ ST(N) dans le foie. Cette hypothèse est d'ailleurs en corrélation avec le fait que l'expression de vecteurs contenant les ADNc de ces facteurs de transcription hépatiques soit capable de transactiver l'expression du promoteur de l'enzyme dans des cellules HepG2 (Svensson et al., 1992).

CONCLUSION

Si la découverte des proto-oncogènes cellulaires a permis d'avancer à grands pas dans la compréhension des mécanismes qui gouvernent la régulation de la croissance de nos cellules et la différenciation de nos tissus, la mise en évidence des mécanismes responsables de leur activation en oncogènes transformants a surtout permis d'établir la relation existant entre altérations génétiques et cancérisation.

Dans ces généralités, nous avons tenté de rappeler le rôle fondamental que jouent ces oncogènes dans la transformation maligne de cellules en culture et dans le développement de tumeurs néoplasiques in vivo. Ainsi, l'étude de certains de ces oncogènes et, en particulier, des oncogènes ras, associés à nombre de cancers humains, a pu aider à définir les différentes étapes séquentielles impliquées dans la formation des tumeurs.

Toutefois, comprendre ne signifie pas guérir. Ainsi, outre leur utilisation dans la mise au point de tests diagnostiques des cancers chez l'Homme, les produits des oncogènes, marqueurs de certains cancers, pourraient aider à l'avenir au développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. De même, les études des modifications de la glycosylation terminale des glycoconjugués membranaires qui accompagnent la transformation maligne et qui résultent en l'apparition d'antigènes onco-fétaux à la surface des cellules, pourraient potentiellement aboutir aux mêmes applications.

Ces modifications qui se traduisent principalement par une augmentation de l'antennarisation et de la sialylation des structures N-acétyllactosaminiques des glycannes des N-glycosylprotéines, modifications d'ailleurs corrélées avec le comportement invasif et métastatique des

cellules tumorales, résultent de variations des activités des glycosyltransférases.

C'est dans ce cadre d'études, et afin de tenter de mieux définir l'implication de l'activation des proto-oncogènes cellulaires, et, en particulier, de l'oncogène humain c-Ha-ras, sur la dérégulation transcriptionnelle des sialyltransférases, que nous avons entrepris ces travaux de recherche.

RESULTATS ET DISCUSSION

COMPARAISON DES ACTIVITES α -1,3-GALACTOSYL- ET SIALYLTRANSFERASIQUES
DES CELLULES NIH3T3 TRANSFORMEES PAR L'ONCOGENE ras : AUGMENTATION
DE L'ACTIVITE DE LA β -GALACTOSIDE α -2,6-SIALYLTRANSFERASE.

I - INTRODUCTION.

Depuis qu'il a été démontré que les cellules eucaryotes transformées viralement ou par transfection d'un oncogène viral, exprimaient à leur surface les mêmes modifications de la glycosylation que les cellules tumorales transformées spontanément ou chimiquement (Smets & van Beek, 1983; Yamashita et al., 1984; Pierce & Arango, 1986), nombre de laboratoires, dont le notre, se sont attachés à l'analyse structurale des glycanes exprimés à la surface de cellules transformées par transfection d'un proto-oncogène cellulaire activé ou placé sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Certains résultats ont permis de montrer que l'activation ou la surexpression des proto-oncogènes c-ras dans des fibroblastes de rongeurs modifiait la glycosylation des protéines (Bolsher et al., 1988) et, en particulier, augmentait le taux de N-glycosylpeptides branchés en β -1,6 à la surface des cellules (Santer et al., 1984; Dennis et al., 1989). Cette modification structurale qui résulte d'une élévation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Dennis & Laferté, 1989), a pu être associée au potentiel invasif et métastatique de fibroblastes de Rat plutôt qu'à l'acquisition même du caractère malin ou tumorigène par ces cellules (Dennis et al., 1987). Ces résultats permettent de penser que les deux événements : augmentation de l'antennarisation des N-glycosylpeptides de surface et acquisition de capacités métastatiques sont directement liés.

Néanmoins, si plusieurs laboratoires ont pu montrer que la transfection des oncogènes ras induisait effectivement le phénotype tumorigène et métastatique de plusieurs lignées cellulaires (Radinsky et al., 1988; Bonfil et al., 1989; Hill et al., 1988; Takiguchi et al., 1992), on ne connaît pas encore par quels mécanismes l'expression anormale des

produits de cette famille d'oncogènes est capable d'altérer l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V et en conséquence, de modifier le comportement des cellules hôtes.

Dans le cas des fibroblastes murins NIH3T3, Santer et al. (1989) ont pu montrer par l'utilisation de méthodes d'analyse physico-chimiques, que les glycopeptides majeurs des cellules non transformées sont tétra-antennés et substitués par des résidus de galactose liés en $\alpha 1,3$. Par contre, dans les cellules transfectées par l'oncogène H-ras, cellules tumorigènes et métastasantes, la structure glycanique majeure est tri-antennée et les résidus de galactose sont remplacés par des résidus de Neu5Ac liés en $\alpha 2,3$.

De manière à corrélérer ces modifications structurales de surface avec l'activité des enzymes responsables de la glycosylation terminale des structures N-glycosidiques, nous avons comparé l'expression de l' α -1,3-galactosyltransférase, de l' α -2,3- et de l' α -2,6-sialyltransférase des cellules NIH3T3 transformées ou non par l'oncogène humain c-Ha-ras. Nous avons pu montrer que la présence de l'oncogène ras dans les cellules tumorigènes et capables de produire des métastases in vivo, ne modifiait pas l'activité α -1,3-galactosyltransférasique mais affectait le transfert d'acide sialique en augmentant d'un facteur 1,4 à 1,8 l'activité de la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase et en diminuant de manière sensible l'activité de la β -galactoside α -2,3-sialyltransférase. En outre, l'activité d'autres glycosyltransférases testées reste comparable entre les deux lignées cellulaires. Enfin, l'utilisation de différentes lectines nous a permis de corrélérer ces observations avec des changements de la glycosylation des glycoprotéines de ces cellules et de montrer que l'oncogènes ras était capable de modifier le phénotype glycoprotéinique conformément aux résultats précédemment décrits pour

nombre de cellules transformées ou cancéreuses.

Le mémoire suivant rapporte l'essentiel des résultats que nous avons obtenus. Il a été publié en 1992 dans Biochimie.

II - PUBLICATION.

Comparison of sialyl- and α -1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 cells transformed with *ras* oncogene: increased β -galactoside α -2,6-sialyltransferase

V Vandamme¹, H Cazlaris^{1**}, N Le Marer¹, V Laudet²,
C Lagrou², A Verbert¹, P Delannoy^{1*}

¹Laboratoire de chimie biologique (Unité Mixte de Recherche du CNRS no 111),
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex ;

²Unité d'oncologie moléculaire (Unité INSERM no 186 et Unité Associée au CNRS no 041160), Institut Pasteur de Lille,
1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France

(Received 10 September 1991; accepted 9 October 1991)

Summary — Previous studies have indicated that transfection of NIH3T3 cells with the *ras* oncogene induced modifications of the terminal glycosylation of N-linked glycans which appeared in the early stage after transfection. These changes affected especially the terminal part of N-linked glycans which is substituted with α -1,3-Gal residues in NIH3T3 and with Neu5Ac residues in the *ras*-transformed counterpart. We have transformed NIH3T3 cells with the human *c-Ha-ras* oncogene, evaluated tumorigenicity and metastatic capacity *in vivo* and compared α -1,3-galactosyltransferase, α -2,3- and α -2,6-sialyltransferases activities. By using different specific acceptors, we detected the enhancement of sialic acid transfer in transformed cells while the activity of α -1,3-galactosyltransferase remained unchanged. We showed that the higher sialyltransferase activity was due to the increase of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in *ras*-transfectant although α -2,3-sialyltransferase was weakly expressed in these cells. On the basis of binding of different lectins, we correlated these observations with changes of protein glycosylation. We concluded that altered glycosylation of *ras*-transformed NIH3T3 is the result of a competitive effect of the enzymes acting for terminal glycosylation of N-linked glycans and the reflection of the higher expression of α -2,6-sialyltransferase.

***c-Ha-ras* oncogene / α -1,3-galactosyltransferase / β -galactoside α -2,6-sialyltransferase / NIH3T3 cells**

Introduction

Malignant transformation of eukaryotic cells induces dramatic molecular and cellular changes. Glycosylation, in particular, is typically altered in transformed cells. The presence of larger N-linked oligosaccharides is one of these changes frequently associated with transformed phenotype [1,2]. The increase in size is the consequence of a greater degree of sialylation and of the multiantennary structure of

the oligosaccharides [3–5]. This last point is associated with elevated GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man-branching of complex type oligosaccharides [6–8] and with the enhanced activity of GlcNAc-transferase V which initiates the synthesis of this antenna [9].

High sialylation and increased branching of N-linked oligosaccharides do not appear to be directly associated with transformation but to be a general feature of metastatic cell populations. In this regard, several observations suggest that increased expression of β 1-6 branched oligosaccharides and high sialylation may be required for cell metastasis. Mutants of metastatic tumor cell lines, showing a decreased GlcNAc-transferase V [10] or inhibition of N-linked glycans processing prior the initiation of β 1-6 antenna exhibit decreased metastasis [11,12]. In the same way, the metastatic potential of tumor cell lines decreases after neuraminidase treatment and appears to be correlated with the level of sialylation [13].

*Correspondence and reprints

**Present address: Institut Pasteur Hellénique, 127 av Vas Sophias, GR 11521, Athens, Greece

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; Neu5Ac, N-5 acetylneuraminic acid; NIH*neo*, pSV2*neo* transfected NIH3T3, NIH-*ras*, *c-Ha-ras*-transfected NIH3T3 fibroblasts; PBS, phosphate 10 mM/NaCl 0.15 M pH 7.4 buffer; PMSF, phenyl methylsulfonyl fluoride; TBS, Tris/HCl 10 mM/0.15 M NaCl/0.02 % Na₂S₂O₅ pH 7.4 buffer.

During the last years, oncogene transfection studies have revealed the implication of such genes in transformation [14]. Some results indicate that transfection of cells by an activated *ras* gene alters protein glycosylation [15] and elevates the level of β 1-6 branched oligosaccharides [16]. This suggests that the ability of an oncogene to confer metastatic potential may be related to its capacity to induce increased branching of N-linked oligosaccharides [17].

However, in the case of NIH3T3 cells, multiantennary oligosaccharides are present in a large proportion in non-transformed cells and terminated with α -1,3-Gal residues. After transformation with H-*ras*, most of glycans are sialylated, Neu5Ac residues replacing the α -1,3-Gal residues [18].

In order to correlate these changes in glycosylation with the activity of the enzymes involved in the terminal processing of N-linked glycans, we compared the expression of β -galactoside α -1,3-galactosyltransferase, α -2,3- and α -2,6-sialyltransferases in NIH3T3 cells transfected or not by the human *ras* oncogene. As described below, transformation increased only the activity of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase which is 1.4- to 1.8-fold higher compared to control. The activity of other enzymes tested remained unchanged in transformed cells. This change in α -2,6-sialyltransferase was correlated with glycan structures of glycoproteins on the basis of lectin-binding properties.

Materials and methods

Materials

All reagents were of analytical grade. CMP-[14 C]-Neu5Ac (262 mCi/mmol (9.61 GBq/mmol)), UDP-[U- 14 C]-Gal (257 mCi/mmol (9.42 GBq/mmol)), L-[35 S]-methionine (800 Ci/mmol; (29.3 TBq/mmol)) and [125 I]IMS.30 were purchased from Amersham Labs (Amersham, UK). Unlabelled CMP-Neu5Ac and UDP-Gal, 2,3-dehydro-2-deoxy-Neu5Ac, fetuin, and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (BSI-B4) were purchased from Sigma Chem Co (St Louis, USA). N-acetyllactosamine, Gal(β 1-4)GlcNAc was obtained from Bio-Carb (Lund, Sweden). Iodo-Gen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycoluril) was from Pierce (Rockford, USA). *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) were from Boehringer (Mannheim, Germany) and anti-P21*ras* monoclonal antibody Y13-259 was from Oncogene Science Inc (USA). α ₁-Acid glycoprotein was purified from human serum [19]. Lacto-N-tetraose, Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, and the oligosaccharides Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)-Man(β 1-4)GlcNAc and Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)-Man(β 1-4)GlcNAc [20] were the gift of Dr G Strecker and Dr JC Michalski. Human serotransferrin glycopeptides [21] were kindly supplied by Pr G Spik.

Cell culture

NIH3T3 mouse fibroblasts and its pSV2*neo* and c-Ha-*ras* EJ transfectants (respectively termed NIH*neo* and NIH*ras*) were grown in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco) with 10 %

fetal calf serum (aseptic serum, Gibco) and antibiotics (DIOFCS). All cultures, as well as transfections, were performed on Falcon plastic Petri dishes or flasks, at 37°C, in a humid atmosphere of 5 % CO₂ in air. Cells were passaged every 3 days by trypsinization. Confluent cultures were harvested by scraping in TBS.

Transfections

Exogenous plasmids DNA pSV2*neo* [22] and pSV2*neo* EJ that carries the 6.6-kbp human c-Ha-*ras* oncogene from the bladder carcinoma cell line EJ [23] were provided by Dr S Saule. Transfections of NIH3T3 were carried out by the calcium phosphate-DNA coprecipitate method of Graham and Van der Eb [24], with minor modifications.

Selection was performed by replacing the medium with 800 μ g/ml geneticine sulfate G418 (Gibco) in DIOFCS [22]. Resistant clones were pooled 15 days later by trypsinization and passaged routinely every 3 days.

Animals

7-week old female Balb C nu/nu mice (IFFA-Credo, Grenoble, France) received subcutaneously in the back 10⁶ NIH3T3 or 10⁶ NIH*neo* or 10⁴ NIH*ras* cells in individual injections of 0.2 ml in DMEM. Animals were killed 5 to 9 weeks later and their organs examined macroscopically for metastases. Fragments of the primary tumors and lungs of NIH*ras*-injected mice were dilacerated and placed into 100-mm Petri dishes in DIOFCS. Three to 5 days later, attached cells and explants were trypsinized and passaged routinely every 3 days.

Immunoprecipitation of the *ras* oncoprotein

Cultures (10⁶ cells) were metabolically labelled by incubation in 2 ml methionine-free DMEM medium supplemented with 200 μ Ci L-[35 S]-methionine for a period of 18 h. Cells were lysed in RIPA buffer (Tris/HCl 10 mM pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % aprotinin) and centrifuged at 100 000 g for 1 h. The *ras* product P21 was immuno-precipitated with the monoclonal antibody Y13-259, fractionated by SDS-PAGE (12.5 % gel) and processed for fluorography [25].

Preparation of cell homogenates

Cells were harvested at confluency by scraping in cold TBS and washed twice in the same buffer. Cells were lysed with 1 ml per flask of sodium cacodylate buffer 10 mM pH 6.5 containing 1 % Triton X-100, 20 % glycerol, 0.5 mM DTT and 5 mM MnCl₂. After 10 min of incubation on ice, centrifugation at 10 000 g (4°C, 15 min), pellets were discarded and the supernatants were either used immediately or stored at -20°C less than 2 weeks before using for enzymatic assays. Protein concentrations of cell homogenates were determined using the Lowry modified method [26,27] with bovine serum albumin as standard.

Preparation of acceptors

The different acceptors were desialylated by mild acid hydrolysis with sulfuric acid 0.1 N at 80°C for 1 h. Sulfuric acid and Neu5Ac were eliminated either by extensive dialysis against water or by gel permeation on Bio-Gel P2 column equilibrated in water. Sugar analysis of desialylated acceptors was carried out by gas-liquid chromatography after methanolysis and trimethylsilylation [28].

Glycosyltransferase assays

Assays were performed at least in duplicate. The incorporation on endogenous substrates as determined in the absence of exogenous acceptors was negligible. Results were expressed as average values as pmol of Gal or Neu5Ac residues transferred per mg of protein.

α -1,3-galactosyltransferase assays

The routine assay system for the UDP-Gal:Gal(β 1-4)GlcNAc-R α -1,3-galactosyltransferase contained in a final volume of 120 μ l: 40 μ l of cell homogenate, 12 μ mol sodium cacodylate (pH 6.0), 6 μ mol MnCl₂, 0.8 μ l Triton X-100, 120 μ g bovine serum albumin, 240 μ mol galactose (as inhibitor of β -galactosidase), 0.6 μ mol ATP, 6.4 nmol UDP-[U-¹⁴C]-Gal (15.65 mCi/mmol (0.57 GBq/mmol) and exogenous acceptor. The mixtures were incubated for 2–8 h at 37°C. The incubates were diluted to 0.5 ml with H₂O to stop the reaction and the amount of incorporated [U-¹⁴C]-Gal was assayed by ion-exchange chromatography on 1 ml Dowex 1 x 8 column (Cl⁻-form, 100–200 mesh) [29].

Sialyltransferase assays

To assay sialyltransferases, the following incubation mixture was used: 40 μ l of cell homogenate, 12 μ mol sodium cacodylate (pH 6.5), 0.8 μ l Triton X-100, 120 μ g bovine serum albumin, 240 μ mol galactose, 0.12 μ mol 2,3-dehydro-2-deoxy-Neu5Ac (as inhibitor of neuraminidase), 6.35 nmol CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac (15.76 mCi/mmol (0.58 GBq/mmol)) and exogenous acceptor. Incubations were performed for 2–8 h at 37°C and the amount of incorporated [¹⁴C]-Neu5Ac was assayed as follows: in the case of asialo-fetuin and asialo- α -acid glycoprotein, the reaction was stopped by addition of 1 ml of ice-cold 5 % phosphotungstic acid in 2 M HCl. The precipitate was collected on glass fiber filter (Whatman GF/C) and washed extensively with 5 % trichloroacetic acid, then with distilled water and ethanol [30] and processed for scintillation counting. Otherwise, the reaction was stopped by boiling samples for 10 min in order to completely release Neu5Ac from unreacted sugar nucleotide donor; no CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac could be recovered afterwards. Samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 min and directly processed for descending paper chromatography using the following solvent: pyridine:ethyl acetate:acetic acid:water (5:5:1:3 vol).

Release of [¹⁴C]-Neu5Ac-labelled oligosaccharides from asialo-fetuin

Asialo-fetuin was incubated in standard conditions of sialyltransferases assay with NIH3T3 and NIHras cell homogenates. Aliquot fractions of each incubation mixture were assayed for incorporation of [¹⁴C]-Neu5Ac as described above. Otherwise, samples were made free of CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac and [¹⁴C]-Neu5Ac by desalting on Bio-Gel P2 column (200–400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate pH 5.6. Then, [¹⁴C]-labelled asialo-fetuin samples were submitted to alkaline treatment under reducing conditions in 0.1 N NaOH containing 1 M NaBH₄ for 48 h at 45°C [31]. At the end of the incubation time, samples were acidified at pH 6 by addition of Dowex 50x8 (H⁺-form, 20–50 mesh) and evaporated. They were resuspended with methanol and evaporated 3 times, dissolved in water and applied to a Bio-Gel P4 column (100 x 1.6 cm, 200–400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate pH 5.6. Aliquots of the fractions were assayed for radioactivity.

Electrophoresis and glycoprotein staining

10⁶ cells were solubilised in 200 μ l of PBS supplemented with 1 % Triton X-100, 5 mM PMSF, 5 mM DTT at 4°C for 30 min

under constant stirring. The lysates were centrifuged at 1500 g for 15 min. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay reagent and bovine serum albumin as the standard. One volume of gel sample buffer (Tris/HCl 0.3 M pH 8.9, 20 % glycerol, 5 %, β -mercaptoethanol, 5 % SDS, 0.001 % bromophenol blue) was added to the supernatants. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 5–24 % gradient gels under reducing conditions using 50 μ g of protein per lane.

Lectins

Sambucus nigra agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (BSI-B4) were radio-labelled by the Iodo-Gen method [32]. Western blottings were done according to classical procedures [33], whereafter, proteins were incubated with the iodinated lectins (10⁶ dpm/ml in PBS, 2 % polyvinylpyrrolidone) for 4 h. The nitrocellulose membranes were then washed extensively, dried and exposed to X-ray film at -70°C. Negative controls for [¹²⁵I]-SNA and [¹²⁵I]-MAA were obtained by treatment of the blots with 50 mU/ml of neuraminidase in 50 mM citrate buffer pH 6.0, 0.9 % NaCl, 0.1 % CaCl₂ for 24 h at 37°C prior incubations with labelled lectins. In the case of [¹²⁵I]-BSI-B4, blots were treated with 50 mU/ml of coffee bean α -galactosidase in 100 mM citrate phosphate buffer pH 6.5 for 48 h at 25°C.

Results

Transfections and evaluation of tumorigenicity

Transfections of pSV2neo or pSV2neo EJ into NIH3T3 cells followed by G418 selection yielded 10 to 50 colonies per dish. These were pooled as described and used to inject animals. NIHneo cells provided a negative control of the neo gene's implication in the tumorigenicity of NIHras cells.

10⁶ NIH3T3 or NIHneo cells failed to produce tumors in groups of 3 control animals, during the 9-week observation period. The control mice were kept under observation for an additional 4-week period and still no tumor appeared. On the other hand, 5 to 9 weeks after injection, 10⁴ NIHras cells produced large primary tumors at the site of injection in all 11 tested mice. No metastasis was macroscopically detected in the lungs, kidneys or livers of these mice.

Several studies on the tumorigenicity of NIHras cells suggest that metastases are formed in the lungs [34]. In our experiments, we only detected micro-metastases by culturing lung fragments of tumor-bearing mice and subjecting the cultures to G418 selection. This yielded drug-resistant colonies of cells morphologically similar to NIHras.

Immunoprecipitation analysis performed with a high specific monoclonal antibody (fig 1) reveals that the introduced ras gene is well expressed as a 21-kDa protein in NIHras as well as in the cell populations from both primary tumors and lung micrometastatic nodules. This observation strongly suggests that metastatic cells derive, as expected, from the primary tumor which itself derives from NIHras infected cells.

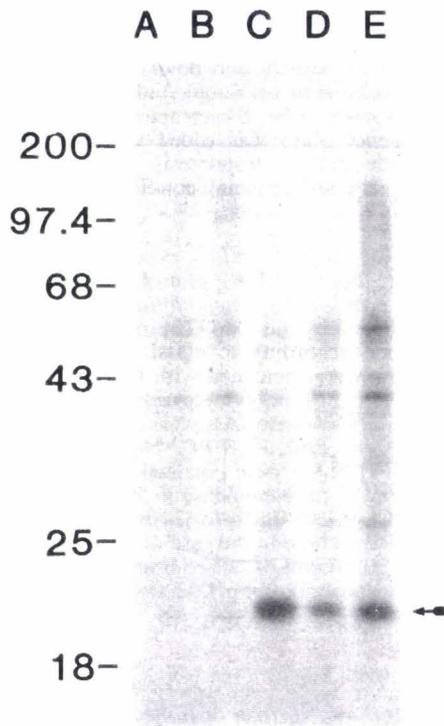


Fig 1. Detection of the P21*ras* oncoprotein by immuno-precipitation. Migrations are as follows: lane A, NIH3T3; lane B, NIH*neo*; lane C, NIH*ras*; lane D, cells from primary tumors; lane E, cells from lung metastases. The left lane indicated the positions of marker proteins for molecular weight estimation. The expected position of P21*ras* is indicated by an arrow.

α-1,3-Galactosyltransferase

According to the fact that α -1,3-Gal residues were described to substitute the terminal position of N-linked glycans of NIH3T3 [18] and that the amount of α -1,3-Gal residues was decreased in *ras*-transformed cells, we assayed the α -1,3-galactosyltransferase activity of NIH3T3 and of its transfected derivative NIH*ras*. α -1,3-Galactosyltransferase was known to be active on glycoproteins, glycopeptides and oligosaccharides having a terminal Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-R) unit [29]. We compared, therefore, the capacity of the cellular homogenates to transfer [14 C]-labelled galactose residues from UDP-[14 C]-Gal onto several representative acceptors of the enzyme. Results, summarized in table I, showed that no significant difference could be detected between NIH3T3 and NIH*ras* cell homogenates with asialo-fetuin, asialo- α ₁-acid glycoprotein, as well as other assayed acceptors, and indicated that the transfer was not modified by the presence of the

activated *ras* gene. The occurrence of the α -linkage of [14 C]-Gal residues was confirmed by showing the sensibility of the galactosylated products towards coffee bean α -galactosidase (data not shown). Kinetic experiments using various concentrations in asialo-serotransferrin glycopeptides allowed us to estimate apparent K_m values which were quite similar for non-transformed and transformed cells (1.90 mM and 1.94 mM respectively for NIH3T3 and NIH*ras*) and in agreement with those reported for calf thymus galactosyltransferase [29]. These observations indicated that the decreased amount of α -1,3-Gal residues in *ras*-transformed NIH3T3 previously reported [18] could not be associated with a decrease of the expression of α -1,3-galactosyltransferase in transformed cells.

Sialyltransferases

As described previously, α -1,3-galactosyltransferase and sialyltransferases were found to be mutually exclusive [29] and the decrease of terminal α -1,3-Gal residues in *ras*-transformed NIH3T3 could be, therefore, the consequence of an elevated sialyltransferase activity. Consequently, in a first set of experiments, sialyltransferase activities of the different cell lines were compared by using asialo-fetuin, asialo- α ₁-acid glycoprotein and glycopeptides from asialo-serotransferrin; table II summarizes the specific sialyltransferase activity of NIH3T3 and NIH*ras* towards these different acceptors. As indicated, transfer of [14 C]-Neu5Ac residues is significantly enhanced in *ras*-transformed cells whatever the assayed acceptor (1.4- to 1.8-fold higher in *ras*-transformed cells compared to control). Asialo- α ₁-acid glycoprotein, which contains only N-linked glycans, five tri- and tetra-antennary complex-type chains [35], as well as glycopeptides from asialo-serotransferrin, which are of the bi-antennary type [21], are specific acceptors for Gal(β 1-4)GlcNAc : α -2,3- or α -2,6-sialyltransferases. Consequently, the elevated transfer observed towards these acceptors indicated that transformation of cells with the *ras* gene enhanced the activity of, at least, one of these enzymes.

On the other hand, asialo-fetuin contains three tri-antennary complex-type chains and three *O*-linked glycans, mainly Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-3)Ser [36]. β -Eliminations were performed on asialo-fetuin sialylated with NIH3T3 and NIH*ras* cellular homogenates and the oligosaccharides obtained after reduction were chromatographed on a Bio-Gel P4 column previously calibrated (fig 2). Gel permeation resolved the reduced oligosaccharides into two main peaks appearing respectively at the elution volume of N-linked glycans

Table I. α -1,3-Galactosyltransferase activity of NIH3T3 and NIHras cell homogenates. The activity of the α -1,3-galactosyltransferase with various acceptors was assayed using the incubation mixture described in *Materials and methods* section. Asialo- α ₁-acid glycoprotein and asialo-fetuin were added in amounts calculated to obtain 0.5 mM of theoretical acceptor sites. N-acetyllactosamine, Gal(β 1-4)GlcNAc, and other acceptors were 4.0 mM.

Acceptor	NIH3T3	NIHras	ratio NIH3T3/NIHras
	nmol mg ⁻¹ h ⁻¹	nmol mg ⁻¹ h ⁻¹	
Asialo- α ₁ -acid glycoprotein	0.163 ± 0.025	0.156 ± 0.015	0.96
Asialo-fetuin	0.134 ± 0.01	0.113 ± 0.015	0.85
Gal(β 1-4)GlcNAc	2.19 ± 0.03	2.33 ± 0.12	0.94
Gal(β 1-4)Glc	0.99 ± 0.01	0.89 ± 0.04	1.10
Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc	0.82 ± 0.01	0.67 ± 0.04	1.21
Man(β 1-4)GlcNAc	4.81 ± 0.05	5.39 ± 0.02	0.89
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)			

(arrow at position 1) and of *O*-linked glycans of fetuin (arrow in position 2). We can observe that transformation of cells with the *ras* gene enhanced only (1.7-fold) the sialylation of N-linked glycans of asialo-fetuin and that the amount of [¹⁴C]-Neu5Ac residues transferred onto *O*-linked glycans was quite similar in both cell lines. According to the ordered sequence of sialylation of the *O*-linked chains and to the high specificity of the α -N-acetylgalactosaminide α -2,6-sialyltransferases [37], the main product obtained using as acceptor the *O*-linked chains of asialo-fetuin is the monosialylated oligosaccharide Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc-ol. These data allowed us to conclude that *ras*-transformation of NIH3T3 enhanced exclusively the activity of sialyltransferases of the N-linked glycans processing without modifying activity of the Gal β 1,3GalNAc α -2,3-sialyltransferase.

Identification of the sialyl linkage

Further experiments were performed to determine the effect of *ras*-transformation on the activity of Gal(β 1-4/3)GlcNAc: α -2,3-sialyltransferase (EC 2.4.99.6) and Gal(β 1-4)GlcNAc: α -2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.1), using oligosaccharides known to be acceptors for both enzymes and the α -2,3- and α -2,6-sialylated isomers which could be easily separated. NIH3T3 and NIHras cellular homogenates were incubated for a period of 20 h with N-acetyllactosamine, Gal(β 1-4)GlcNAc, or with the oligosaccharides Gal (β 1-4)GlcNAc(β 1-2)-Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc and Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc corresponding respectively to each arm of a bi-antennary complex-type glycan. Incubation mixtures were then analysed by paper chromatography and run in the

Table II. Sialyltransferase activity of NIH3T3, NIHneo and NIHras cell homogenates. Incubations were performed in the standard conditions described in *Materials and methods* section. Asialo-fetuin, asialo- α ₁-acid glycoprotein and asialoserotransferrin glycopeptides (ASTFgp) were respectively 0.5 mM, 0.5 mM and 4.0 mM of theoretical acceptor sites (as calculated from the galactose content of each acceptor). Results are expressed as mean values of two separate experiments in pmol of [¹⁴C]-Neu5Ac residues transferred per mg of protein contained in cell homogenate and per hour.

Acceptor	Specific activity (pmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹)			ratio NIHras / NIH3T3
	NIH3T3	NIHneo	NIHras	
	pmol mg ⁻¹ h ⁻¹	pmol mg ⁻¹ h ⁻¹	pmol mg ⁻¹ h ⁻¹	
Asialo-fetuin	171 ± 5	nd	296.5 ± 4	1.73
Asialo- α ₁ -acid glycoprotein	112 ± 3.5	nd ^a	160 ± 5	1.42
ASTFgp	560 ± 7.5	575 ± 11.5	977 ± 25	1.74

^and : not determined.

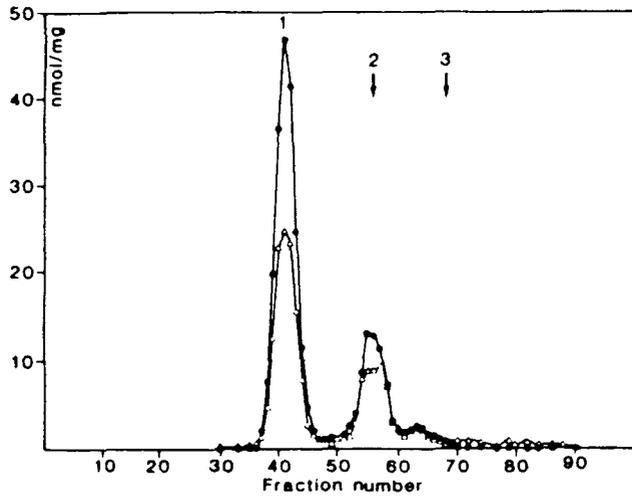


Fig 2. Fractionation by gel permeation of the [¹⁴C]-sialylated glycans obtained from asialo-fetuin sialylated by NIH3T3 and NIHras cellular homogenates. Reduced oligosaccharides were separated on a column (100 x 1.6 cm) in pyridine acetate pH 5.6 and eluted with the same buffer at a flow rate of 12 ml/h. Fractions of 1.85 ml were collected and assayed for radioactivity. The column was previously calibrated with: (1), N-glycans; (2), O-linked chains of fetuin; (3), Neu5Ac. (—△—△—) and (—●—●—) correspond respectively to asialo-fetuin sialylated by NIH3T3 and NIHras cellular homogenates.

transferred in α-2,3 linkage was lower than transferred in α-2,6 linkage and it appeared a decrease of α-2,3-isomers with NIHras cells. Furthermore, the transfer of [¹⁴C]-Neu5Ac residues in α-2,6-linkage was clearly enhanced in transformed cells as indicated by the ratio between α-2,6- and α-2,3-isomers which shifted from 1.5–1.95 for NIH3T3 to 4.8–5.95 for NIHras.

Kinetics experiments using different concentrations of the oligosaccharide Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)Man(β1-4)GlcNAc allowed us to estimate V_{max} and apparent K_m values for both enzymes (table IV). As we observed in the previous experiments, α-2,3-sialyltransferase activity decreased in NIHras cells, the V_{max} values shifted from 122.4 pmol mg⁻¹ h⁻¹ to 68.6 pmol mg⁻¹ h⁻¹. Besides, an apparent K_m of α-2,6-sialyltransferase toward this acceptor was not significantly modified by the presence of the *ras* gene in NIH3T3 cells (0.42 mM and 0.54 mM respectively for NIH3T3 and NIHras) and the elevated α-2,6-sialyltransferase activity of NIHras correlated with the 2.3-fold higher V_{max} value determined in this experiment. These results suggest that the increased activity is due to a change in the number of active molecules in transformed cells rather than in the modulation of the catalytic activity. Similar results were previously obtained with another cellular model transformed with the *ras* gene [38].

Increase of Gal(β1-4)GlcNAc: α-2,6-sialyltransferase in ras-transformed NIH3T3 correlates with changes in terminal glycosylation of cell glycoproteins

The effects of the *ras* oncogene on the terminal glycosylation of cell glycoproteins were detected on the basis of the specificity of three lectins: *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) which recognizes the Neu5Ac-

presence of α-2,3- and α-2,6-sialylated isomers of each oligosaccharide as standard, (40 h for N-acetyl-lactosamine and 4 days for other oligosaccharides). Table III reports, for each acceptor, the total amount of sialic acid transferred by NIH3T3 and NIHras cellular homogenates and the ratio α-2,6-isomer / α-2,3-isomer. The amount of [¹⁴C]-Neu5Ac residues

Table III. Identification of the sialyl linkage. NIH3T3 and NIHras cell homogenates were incubated for 20 h with the oligosaccharide acceptor for Gal(β1-4-)GlcNAc: α-2,3-sialyltransferase and Gal(β1-4)GlcNAc: α-2,6-sialyltransferase. The amounts of both sialylated isomers were determined by descending paper chromatography (see the next for details).

Acceptor structure	Neu5Ac(α2-6)R (nmol mg ⁻¹)		Neu5Ac(α2-3)R (nmol mg ⁻¹)		Ratio (α2-6) / (α2-3)		
	NIH3T3	NIHras	NIH3T3	NIHras	NIH3T3	NIHras	
Gal(β1-4)GlcNAc	0.0665	0.111	0.040	0.023	1.66	4.83	
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)							
	Man(β1-4)GlcNAc	1.32	2.27	0.87	0.42	1.50	5.40
	Man(β1-4)GlcNAc	1.20	2.25	0.61	0.38	1.95	5.95
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)							

Table IV. Kinetic parameters of α -2,3- and α -2,6-sialyltransferases from NIH3T3 and NIH*ras*. Incubations were performed using various concentrations of the oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc for 4 h at 37°C. Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) were calculated from Dixon plots ($[S]$ versus $[S]/v$).

Activity	α -2,6-ST		α -2,3-ST	
	V_{max} ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_m (mM)
Cells				
NIH3T3	121.2	0.42	122.4	0.21
NIH <i>ras</i>	279.2	0.54	68.6	0.56

(α -6)Gal/GalNAc sequence with a 50–100-fold higher affinity than the Neu5Ac(α 2-3)Gal/GalNAc sequence [39]; *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) which, at the opposite to SNA, interacts with high affinity with complex-type N-linked glycans containing Neu5Ac(α 2-3)-linked to penultimate galactose residues [40]; and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (BSI-B4) which exhibits a sharp specificity toward α -1,3-Gal residues [41]. 50 μg of cell glycoproteins were separated by SDS-PAGE and stained with [^{125}I]-labelled lectins. For each lectin, a negative control was obtained by treatment with either α -galactosidase or neuraminidase. As indicated in figure 3, the binding of [^{125}I]-BSI-B4 on NIH*ras* glycoproteins is close similar to control. This can be correlated with the unchanged α -1,3-galactosyltransferase activity expressed by these cells. Beside this, the increased binding of [^{125}I]-labelled SNA on NIH*ras* glycoproteins reflects the larger amount of 2,6-linked Neu5Ac residues in transformed cells. This increased binding does not process from the appearance of new labelled bands but from a higher intensity of the labelling of glycoproteins which already exists but with a lower binding in normal cells. In parallel, a weak staining of these glycoproteins with [^{125}I]-MAA allowed to detect a decrease of α -2,3-Neu5Ac residues. All these observations were positively correlated with the activity of the enzymes involved in the biosynthesis of these terminal sequences.

Discussion

Transfection of *ras* oncogenes in NIH3T3 cells leads to changes in cell surface carbohydrates concomitantly with the induction of tumorigenicity [42,43] and invasive capacity [44]. Moreover, it has been demonstrated that altered protein glycosylation

appeared within 25 h of transfection, before the appearance of morphological transformation [15]. On the basis of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and binding to lectins, the nature of these changes was partially resolved [18]. *ras* transfection affected especially the terminal part of N-linked glycans of NIH3T3. Glycans of non-transformed NIH3T3 are predominantly neutral and contained terminal α -1,3-Gal. In contrast, 90% of the N-linked glycans of *ras*-transfectants contain two or more charged residues. Here we have tried to establish a relationship between these changes in glycosylation and the activity of the enzymes involved in the processing of the terminal part of N-linked oligosaccharides.

NIH3T3 were transfected using calcium phosphate coprecipitation technique with the pSV2*neo* EJ plasmid. We have shown that cells obtained after geneticine selection well expressed the *ras* gene product as a 21 kDa protein. These cells presented a transformed phenotype and were able to produce tumors after injection in mice. No metastatic nodules were detected macroscopically 9 weeks after the injection but by culturing lung fragments of tumor-bearing animals and geneticine G418 selection, we were able to detect in lungs the presence of cells deriving from the primary tumors and, therefore, to characterize the metastatic capacity of these cells. The absence of visible metastases could be due to the too short a period of observation.

The activity of β -galactosidase α -1,3-galactosyltransferase was well expressed in NIH3-T3 and was not significantly modified by the presence of the *ras* gene. We have assayed several representative oligosaccharide acceptors as well as asialo-fetuin and asialo- α -₁-acid glycoprotein. In all the cases, NIH3T3 and NIH*ras* cell homogenates exhibited the same capacity to transfer Gal residues in α -1,3 linkage. The specificity of the enzyme appeared to be quite similar to calf thymus α -1,3-galactosyltransferase [29]. Unsubstituted Gal(β 1-4)GlcNAc unit was the best acceptor substrate for NIH3T3 α -1,3-galactosyltransferase and the activity was enhanced when this sequence was in non-reducing terminal position of N-linked complex-type glycans. The activity was 2.5-fold decreased by changing the linkage Gal(β 1-4)GlcNAc to Gal(β 1-3)-GlcNAc or by replacing GlcNAc residue by glucose.

Cell membrane glycoconjugates with terminal α -1,3-Gal residues have been demonstrated in a lot of tumor cell lines [45–48]. Particularly, α -1,3-galactosyltransferase activity has been characterized in murine Ehrlich carcinoma cells [49] and is responsible for the expression of high levels of cell surface α -1,3-Gal containing glycoproteins. Whereas structural studies have indicated that *ras*-transformed NIH3T3 expressed a lower amount of α -1,3-Gal residues [18], we have shown that α -1,3-galactosyltransferase

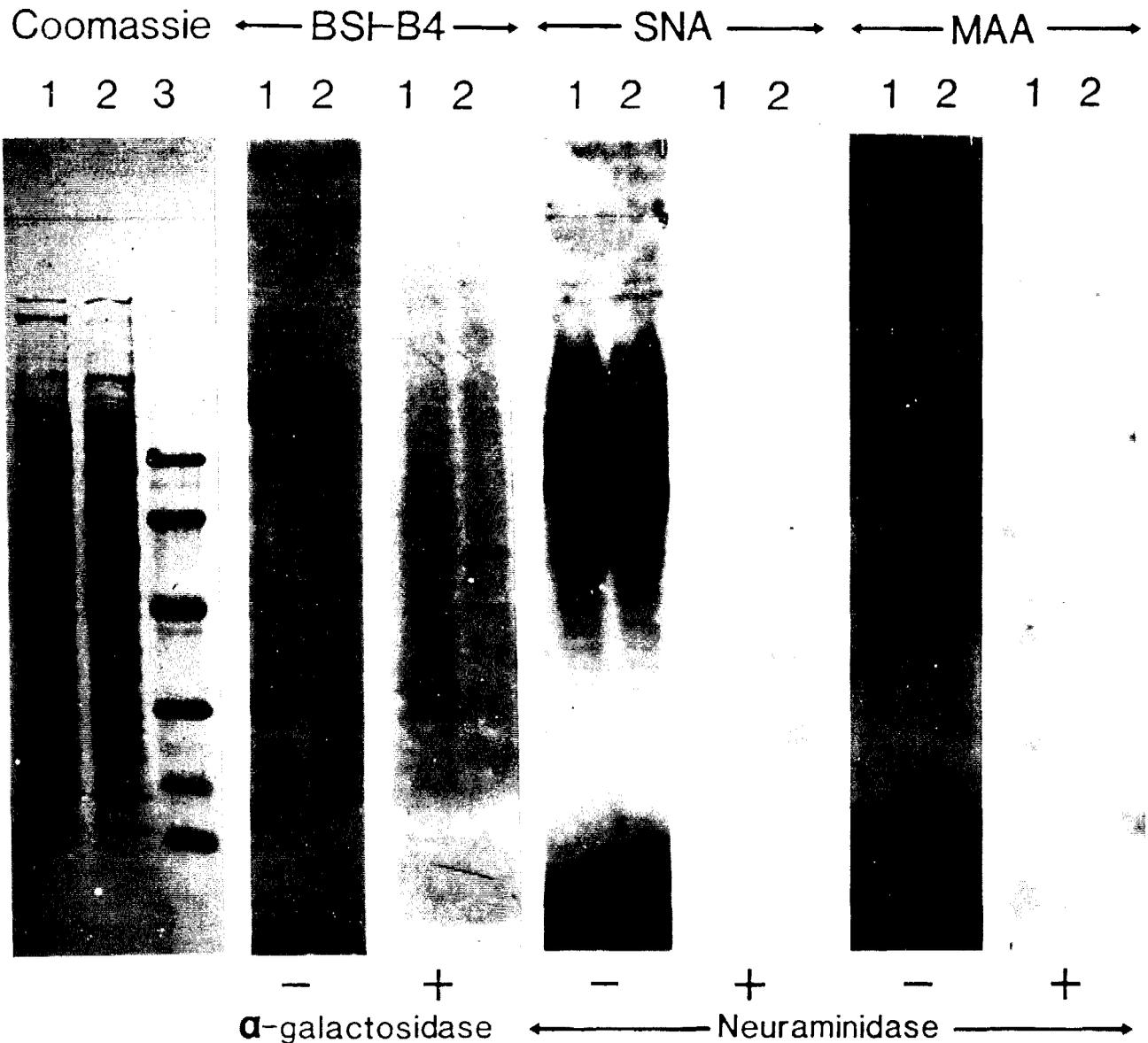


Fig 3. Lectin blots of glycoproteins from NIH3T3 and NIHras cells separated by SDS-PAGE. 50 μ g of protein were separated by SDS-PAGE and stained with either Coomassie blue or radio-labelled lectins as described in *Materials and methods*. Lane 1, NIH3T3 cellular homogenate; lane 2, NIHras cellular homogenate. For each lectin, the right parts of the blot were treated with either neuraminidase for the negative control of [125 I]-SNA and [125 I]-MAA or coffee bean α -galactosidase for [125 I]-BSI-B4 binding. Lane 3 on the Coomassie stained blot indicated the position of marker proteins used for molecular weight estimation: phosphorylase *b* (94 000), albumin (67 000), ovalbumin (43 000), carbonic anhydrase (30 000), trypsin inhibitor (20 100) and α -lactalbumin (14 400).

activity remained unchanged in these cells and no significant change in the binding of [125 I]-labelled BSI-B4 has been detected on NIHras cell glycoproteins. α -1,3-galactosyltransferase and sialyltransferases have been demonstrated to be mutually exclus-

ive for glycosylation of terminal N-acetylglucosamine units of N-glycans. In addition, it has been demonstrated that this enzyme acts preferentially on the GlcNAc(β 1-2) antenna linked on the Man(α 1-6) arm of tri- and tetra-antennary glycans [50, 51]. The

decreased amount of α -1,3-Gal residues described in the previous study [18] could be, therefore, the consequence of a competitive effect of sialyltransferases.

In contrast to what we expected, according to the structural studies and, particularly, to $[^1\text{H}]\text{-NMR}$ analysis which showed in *ras*-transformed NIH3T3 α -1,3-Gal residues are at least partially replaced by Neu5Ac residues in α -2,3-linkage, we demonstrated that *ras*-transformation of NIH3T3 affected mainly β -galactoside α -2,6-sialyltransferase. This activity is 1.7–1.8-fold increased in *ras*-transfectants while Gal(β 1-4/3)-GlcNAc: α -2,3-sialyltransferase activity is decreased and sialyltransferases specific for O-linked glycans were not affected by the presence of the activated *ras* gene. In parallel, the binding of $[^{125}\text{I}]$ -labelled SNA was by far higher in the case of NIH*ras* and testified to an increased amount of α -2,6-linked Neu5Ac residues. While SNA can also recognize Neu5Ac(α -2,6)-GalNAc sequences of O-glycans, this result seems to be correlated with the increased expression of the β -galactoside α -2,6-sialyltransferase. Furthermore, a decrease of the binding of $[^{125}\text{I}]\text{-MAA}$, specific for N-linked glycans sialylated in α -2,3 linkage, has been detected in NIH*ras* cells.

While numerous studies have described the increase of sialyltransferase activity in virally transformed cells as well as in serum of tumor-bearing patients, little has been done about oncogene-transformed cells. Moreover, if sialyltransferases processing for glycolipids, N-linked and O-linked glycans of glycoproteins were assayed separately on the basis of the specificity of the acceptors, no discrimination was made between Gal(β 1-4/3)GlcNAc: α -2,3-sialyltransferase and Gal(β 1-4)GlcNAc: α -2,6-sialyltransferase. These previous results have suggested that high sialylation and elevated sialyltransferase activity were not a general feature of transformed cells but that high branched, high sialylated N-linked complex-type glycans were required for the total expression of transformed phenotype and for tumor cell metastasis.

However, the activity of the glycosyltransferases of NIH3T3 cells expressing the N-*ras* proto-oncogene has been recently investigated [52] and the results are very similar to those we obtained. In particular, the authors have observed a slight decrease of the α -1,3-galactosyltransferase and the increased levels of sialyltransferases, especially for the β -galactoside α -2,6-sialyltransferase, leading to the substitution of terminal α -Gal residues by sialic acid moieties. Moreover, the authors described the increased expression of other glycosyltransferases, resulting in more highly branched N-glycans, which could also explained the higher amount of sialic acid residues at the cell surface.

Moreover, it has been recently demonstrated that elevated expression of β -galactoside α -2,6-sialyltrans-

ferase, as well as of mRNA encoding for the enzyme, in Fisher rat fibroblasts transformed with c-Ha-*ras* [53]. The elevated level of α -2,6-sialyltransferase and the associated high levels of Neu5Ac(α -2,6)Gal units were only observed in *ras*-transformed cells but not in several other oncogene-transformed cells. Besides, changes in glycosylation of *ras*-transfected NIH3T3 occurred in the early stage after transfection, prior the appearance of transformed phenotype [15]. According to these data, altered glycosylation and, especially, increase in α -2,6-sialylation appeared to be a specific effect of the *ras* gene, and not a consequence of cellular transformation.

At present, the mechanism by which the *ras* gene activated β -galactoside α -2,6-sialyltransferase synthesis is not known. This enzyme was cloned from rat liver cDNA library [54] and recent advances indicated tissue specific isoforms based on, at least, two different initiation sites and alternative splicing of mRNA [55]. The presence of an activated *ras* gene could interfere with a normal regulation process of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase gene expression and induce the synthesis in cells in which this enzyme is normally low expressed. The expression of rat liver β -galactoside α -2,6-sialyltransferase is activated by glucocorticoids as dexamethasone [56]. The presence of the *ras* gene could reproduce a corticoid-like effect in fibroblastic cells normally insensible to this control. On that topic, studies on *ras*-induced increase of β -2,6-sialyltransferase could be able to give some informations on the genetic regulation of the expression of this enzyme.

Acknowledgements

We thank Doctor Gérard Strecker for generous gift of oligosaccharides and Prof Geneviève Spik for glycopeptides of asialo-serotransferrin. This work was supported by the CNRS (UMR no111), the INSERM, the Pasteur Institute of Lille and the Lille University of Sciences.

References

- 1 Santer UV, Glick MC (1979) Partial structure of a membrane glycopeptide from virus-transformed hamster cells. *Biochemistry* 18, 2533–2540
- 2 Smets LA, Van Beek WP (1984) Carbohydrates of the tumor cell surface. *Biochim Biophys Acta* 738, 237–249
- 3 Warren L, Fuhrer JP, Buck CA (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
- 4 Montreuil J, Debray H, Debeire P, Delannoy P (1983) Lectins as oligosaccharide receptors. In: *Structural Carbohydrates in the Liver* (Popper M, Reutter W, Kottgen E, Gudat F, eds) MTP Press, Boston, 239–258
- 5 Delannoy P, Debray H, Montreuil J (1985) Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation des cellules BHK21/C13 induite par le virus du sarcome du Hamster. *CR Acad Sci* 301, 767–772

- 6 Takasaki S, Ikehira H, Kobata A (1980) Increase of asparagine-linked oligosaccharides with branched outer chains caused by cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 92, 735-742
- 7 Yamashita K, Ohkura T, Tachibana Y, Takasaki S, Kobata A (1984) Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis. *J Biol Chem* 259, 10834-10840
- 8 Pierce M, Arango J (1986) Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of Asn-linked tri- and tetra-antennary glycopeptides containing [GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man] and poly-N-acetyl-lactosamine sequences than baby hamster kidney cells. *J Biol Chem* 261, 10772-10777
- 9 Yamashita K, Tachibana Y, Ohkura T, Kobata A (1985) Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J Biol Chem* 260, 3963-3969
- 10 Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS (1987) β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236, 582-585
- 11 Humphries MJ, Matsumoto K, White SL, Olden K (1986) Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice: blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. *Cancer Res* 46, 5215-5222
- 12 Dennis JW (1986) Different metastatic phenotypes in two genetic classes of wheat germ agglutinin-resistant tumor cell mutants. *Cancer Res* 46, 5131-5136
- 13 Yogeewaran G, Salk PL (1981) Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* 212, 1514-1516
- 14 Mareel MM, Van Roy FM (1986) Are oncogenes involved in invasion and metastasis? *Anticancer Res* 6, 419-436
- 15 Bolscher JGM, Van der Bijl MMW, Neefjes JJ, Hall A, Smets LA, Ploegh HL (1988) Ras (proto)-oncogene induces N-linked carbohydrate modification: temporal relationship with induction of invasive potential. *EMBO J* 7, 3361-3368
- 16 Dennis JW, Laferté S (1989) Oncodevelopmental expression of GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β 1-branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas. *Cancer Res* 49, 945-950
- 17 Dennis JW, Kosh K, Bryce DM, Breitman ML (1989) Oncogenes conferring metastatic potential induce increased branching of Asn-linked oligosaccharides in Rat2 fibroblasts. *Oncogene* 4, 853-860
- 18 Santer UV, De Santis R, Hard KJ, Van Kuik JA, Vliegenthart JFG, Won B, Glick MC (1989) N-linked oligosaccharide changes with oncogenic transformation require sialylation of multiantenna. *Eur J Biochem* 181, 249-260
- 19 Schmid K, Mac Nair MB, Burgi AF (1958) The chromatographic separation and purification of acidic proteins on carboxylated ion exchange resins. *J Biol Chem* 230, 853-864
- 20 Michalski JC, Strecker G, Van Halbeck H, Dorland L, Vliegenthart, JFG (1982) The structures of six urinary oligosaccharides that are characteristic for a patient with marquo syndrome type B. *Carbohydr Res* 100, 351-363
- 21 Spik G, Bayard B, Fournet B, Strecker G, Bouquetet S, Montreuil J (1975) Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. *FEBS Lett* 50, 296-301
- 22 Southern EM, Berg P (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of SV-40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1, 327-341
- 23 Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149
- 24 Graham FL, Van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467
- 25 Martin P, Henry C, Ferré F, Duterque-Coquillaud M, Lagrou C, Ghysdael J, Debuire B, Stéhelin D, Saule S (1986) Transforming of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J* 5, 1529-1533
- 26 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- 27 Peterson GL (1977) Modified procedure for protein assay. *Anal Biochem* 83, 346-356
- 28 Kamerling JP, Gerwig GJ, Vliegenthart JFG, Clamp JR (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylglycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J* 151, 491-495
- 29 Blanken WM, Van den Eijnden DH (1985) Biosynthesis of terminal Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. *J Biol Chem* 260, 12927-12934
- 30 Cacan R, Verbert A, Montreuil J (1976) New evidence for cell surface galactosyltransferase. *FEBS Lett* 63, 102-106
- 31 Spiro RG, Bhojroo VD (1974) Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem* 249, 5703-5717
- 32 Fraker PJ, Speck JC Jr (1978) Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro 3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80, 849-857
- 33 Glass II WF, Briggs RC, Hnilica LS (1981) Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. *Anal Biochem* 115, 219-224
- 34 Kerbel RS, Waghorne C, Man MS, Elliott B, Breitman ML (1987) Alteration of the tumorigenic and metastatic properties of neoplastic-cells is associated with the process of calcium phosphate mediated DNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1263-1267
- 35 Fournet B, Montreuil J, Strecker G, Dorland L, Haverkamp J, Vliegenthart JFG, Binette JP, Schmid K (1978) Determination of the primary structure of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma α 1-acid glycoprotein by 360-MHz ^1H NMR spectroscopy and permethyl analysis. *Biochemistry* 17, 5206-5214
- 36 Nilsson B, Norden NE, Svensson S (1979) Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J Biol Chem* 254, 4545-4553
- 37 Bergh MLE, Hooghwinkel GJM, van den Eijnden DH (1983) Biosynthesis of the O-glycosidically linked oligosaccharide chains of fetuin. Indications for an α -N-acetyl-galactosaminide α -2,6-sialyltransferase with a narrow acceptor specificity in fetal calf liver. *J Biol Chem* 258, 7430-7436

- 38 Cazlaris H, Le Marer N, Laudet V, Lagrou C, Zhu Q, Delannoy P, Montreuil J (1991) Modifications de la sialylation des cellules BHK 21/C13 après transfection *in vitro* par l'oncogène humain c-Ha-ras. *CR Acad Sci* 312, 293-300
- 39 Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ (1987) The elderberry (*Sambucus nigra* L) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)-Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 262, 1596-1601
- 40 Wang WC, Cummings RD (1988) The immobilized Leucoagglutinin from seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α -2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem* 263, 4576-4585
- 41 Murphy LA, Goldstein IJ (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem* 252, 4739-4742
- 42 Santer UV, Gilbert F, Glick MC (1984) Change in glycosylation of membrane glycoproteins after transfection of NIH3T3 with human tumor DNA. *Cancer Res* 44, 3730-3735
- 43 Collard JG, Van Beek WP, Janssen JWG, Schijven JF (1985) Transfection by human oncogenes: concomitant induction of tumorigenicity and tumor-associated membrane alterations. *Int J Cancer* 25, 207-214
- 44 Bolscher JGM, Schallier DCC, Smets LA, Van Roy H, Collard JG, Bruyneel EA, Mareel MMK (1986) Effects of cancer-related and drug-induced alterations in surface carbohydrates on the invasive capacity of mouse and rat cells. *Cancer Res* 46, 4080-4086
- 45 Kamagi R, Levery SB, Hakomori SI (1984) Hybrid type glycolipids (lacto-ganglio series) with a novel branched structure. Their presence in undifferentiated murine leukemia cells and their dependence on differentiation. *J Biol Chem* 259, 8444-8451
- 46 Stanley WP, Peters BP, Blake DA, Yep D, Chu EHY, Goldstein IJ (1979) Interaction of wild-type and variant mouse 3T3 cells with lectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 303-307
- 47 Dennis JW, Laferté S, Fukuda M, Dell A, Carver JP (1986) Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants varying metastatic potential. *Eur J Biochem* 161, 359-373
- 48 Debray H, Dus D, Wieruszkeski JM, Strecker G, Montreuil J (1991) Structures of the α (1-3)-galactose-containing asparagine-linked glycans of a Lewis lung carcinoma cell subline resistant to *Aleuria aurantia* agglutinin: elucidation by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Glycoconjugate J* 8, 29-67
- 49 Elices MJ, Blake DA, Goldstein IJ (1986) Purification and characterization of a UDP-Gal: β -D-Gal(1.4)-D-GlcNAc α -(1.3)galactosyltransferase from Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 261, 6064-6072
- 50 Van den Eijnden DH, Joziassse DH, Koenderman AHL, Blanken WM, Schiphorst WECM, Koppen PL (1985) What do glycosyltransferases recognize? Studies on three enzymes acting on N-acetylglucosaminide acceptor structures. In: *Proc. VIIIth Int Symp Glycoconjugates Vol. 1* (Davidson EA, Williams JC, Di Ferrante NM, eds) Fraeger Scientific, NY, 285-286
- 51 Elices MJ, Goldstein IJ (1989) Biosynthesis of bi-, tri-, and tetra-antennary oligosaccharides containing α -D-galactosyl residues at their nonreducing termini. Branch specificity of the Ehrlich tumor cell α (1.3)-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 264, 1375-1380
- 52 Easton EW, Bolscher JGM, van den Eijnden DH (1991) Enzymatic amplification involving glycosyltransferases forms the basis for the increased size of asparagine-linked glycans at the surface of NIH 3T3 cells expressing the N-ras proto-oncogene. *J Biol Chem* (in press)
- 53 Le Marer N, Laudet V, Svensson EC, Cazlaris H, Van Hille B, Lagrou C, Stéhelin D, Montreuil J, Verbert A, Delannoy P (1991) The c-Ha-ras oncogene induces increased expression of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblasts (FR3T3) cells. *Glycobiology* (in press)
- 54 Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai PH, Paulson JC (1987) Primary structure of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH_2 -terminal signal anchor. *J Biol Chem* 262, 17735-17743
- 55 Wang XC, O'Hanlon TP, Young RF, Lau JTY (1990) Rat β -galactoside α 2,6-sialyltransferase genomic organization: alternate promoters direct the synthesis of liver and kidney transcripts. *Glycobiology* 1, 25-31
- 56 Wang XC, O'Hanlon TP, Lau JTY (1989) Regulation of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone. *J Biol Chem* 264, 1854-1859

III - DISCUSSION ET CONCLUSION.

Plusieurs laboratoires ont préalablement démontré que les cellules NIHras métastasaient au poumon après injection sous cutanée en système homologue (Bondy et al., 1985; Egan et al., 1987; Hill et al., 1988; Takiguchi et al., 1992). Conformément à ces résultats, il apparaît que l'induction des capacités tumorigène et métastasante de nos cellules soit directement liée à l'expression transformante de l'oncogène humain c-Ha-ras, les cellules isolées des tumeurs primaires et des micrométastases exprimant, tout comme les cellules NIHras, la protéine p21.

Bien que les mécanismes mis en jeu dans cette relation de cause à effet n'aient pas encore pu être établis, certains résultats récents pourraient en partie permettre d'expliquer l'apparition des capacités métastasantes induite par l'expression d'un oncogène. En effet, Seiki et al. (1991) ont pu montrer que les cellules transformées par l'oncogène N-ras, acquièrent, à l'instar de cellules isolées de métastases de patients atteints de cancers avancés, la capacité de produire de façon autocrine, des facteurs de "mobilité cellulaire" MAFs (motility autocrine factors) qui stimulent leur propre mobilité. Toutefois, il semble très probable, comme cela a déjà été démontré pour des cellules isolées de tumeurs spontanées ou transformées viralement, que les capacités métastasantes des cellules transformées par l'activation ou par la surexpression d'un proto-oncogène cellulaire, soient également liées à l'altération de la glycosylation terminale des glycanes de surface et, en particulier, à une augmentation de l'antennarisation et de la sialylation des structures N-glycosidiques.

Conformément aux observations structurales de Santer et al. (1989) qui avaient pu corréler l'augmentation de la sialylation en α -2,3 (au détriment du nombre de résidus de galactose liés en α -1,3 sur les

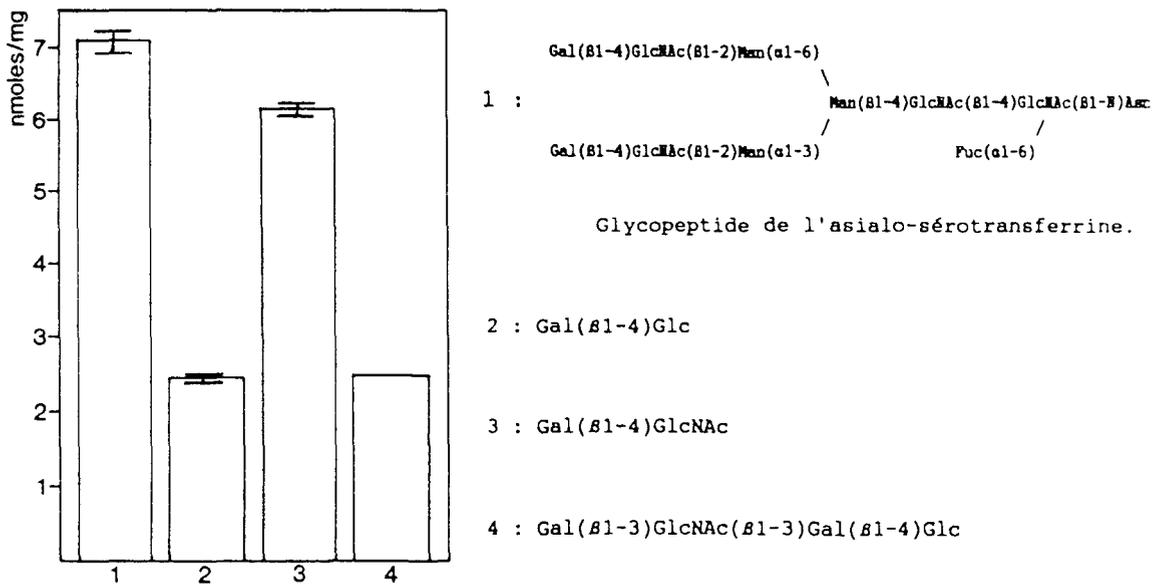


Figure 23 : Comparaison de l'activité α -1,3-galactosyltransférase des cellules NIH3T3 vis-à-vis de différents accepteurs.

L'incubation a été effectuée 4 h à 37°C dans les conditions standard. Les accepteurs (1 : glycopeptides de l'asialo-sérotransferrine, 2 : le lactose, 3 : la N-acétyllactosamine et 4 : le lacto-N-tétraose) sont à une concentration de 4 mM en Gal terminaux. Le transfert de [U-¹⁴C]-Gal est exprimé en nmol/mg de protéines.

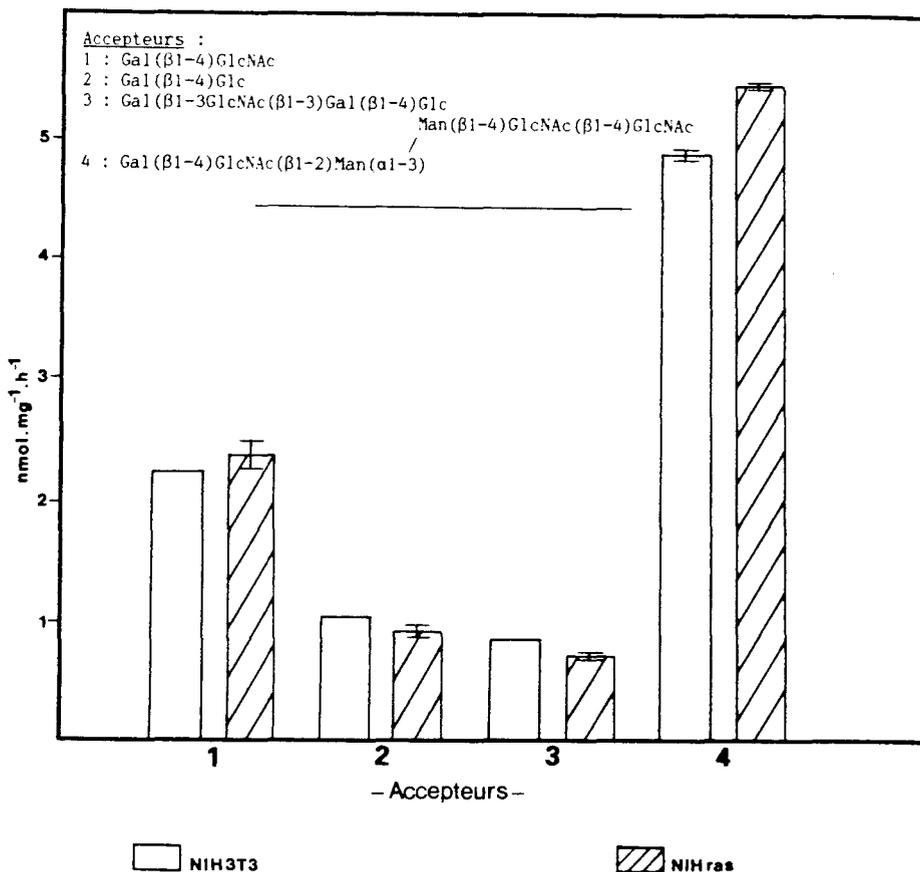


Figure 24 : Comparaison des activités α -1,3-galactosyltransférales des cellules NIH3T3 et NIHras vis-à-vis des différents accepteurs.

Les incubations ont été effectuées 4 h à 37°C dans les conditions standard. Les accepteurs sont à une concentration de 4 mM en Gal terminaux. Le transfert de [U-¹⁴C]-Gal est exprimé en nmol/mg de protéines/h.

structures N-glycosidiques) avec les capacités tumorigènes et métastatiques des cellules NIHras, nous avons donc comparé les activités α -1,3-galactosyltransférase et sialyltransférases des cellules NIH3T3.

Pour ce faire, il nous était nécessaire au préalable de définir un ou plusieurs accepteurs communs aux deux types d'enzymes. Sur la base des paramètres cinétiques et de la spécificité de l' α -1,3-galactosyltransférase de thymus de Veau qui avaient été précisés par Blanken et van den Eijnden (1985), nous avons tenté de définir dans un premier temps le spécificité de substrat de l' α -1,3-galactosyltransférase de la lignée cellulaire NIH3T3 en mesurant l'activité de transfert du galactose vis-à-vis de différents accepteurs (Fig.23, p.120). Tout comme l'enzyme de thymus de Veau, il nous est apparu que l'enzyme des cellules NIH3T3 reconnaissait plus spécifiquement la séquence disaccharidique Gal(β 1-4)GlcNAc et que son affinité augmentait lorsque cette séquence se trouvait en position terminale non réductrice d'une structure de type N-acétyllactosaminique telle que les glycopeptides de l'asialo-sérotransferrine (Fig.23, p.120).

En outre, comme le montre la figure 24 (p.120), cette spécificité de l'enzyme n'est pas affectée par la présence de l'oncogène ras. Par des expériences de cinétique, nous avons pu déterminer les constantes d'affinité apparente de l'enzyme vis-à-vis des glycopeptides de l'asialo-sérotransferrine. Les valeurs de Km apparent déterminées par la méthode-

de Dixon pour les cellules NIH3T3 et NIHras (respectivement 1,90 mM et 1,94 mM) nous ont permis de conclure, d'une part, que les enzymes exprimés dans les deux types cellulaires présentaient les mêmes caractéristiques catalytiques et, d'autre part, ces valeurs étant proches de

celles obtenues par Blanken et van den Eijnden (1985), que l'activité α -1,3-galactosyltransférase exprimée dans cette lignée fibroblastique était comparable à celle du thymus de Veau.

De fait, sur la base de ces résultats nous avons choisi comme accepteurs : l'asialo-orosomucoïde, les glycopeptides de l'asialo-sérot transferrine et l'asialo-féтуine.

Or, ces trois accepteurs étant également des accepteurs spécifiques de l' α 2,3ST(N/O) et de l' α 2,6ST(N) (Rearick et al., 1979; Weinstein et al., 1982b), l' α -1,3-galactosyltransférase et les sialyltransférases sont de fait mutuellement exclusives pour la glycosylation terminale des structures N-acétyllactosaminiques des N-glycosylprotéines. Ayant démontré que l'activité de l' α -1,3-galactosyltransférase était pratiquement similaire entre les deux types de cellules et que l'activité de l' α 2,6ST(N) était nettement augmentée par transfection de l'oncogène ras, il nous est apparue que la diminution du nombre de résidus d' α -1,3-Gal observée dans les cellules NIHras (Santer et al., 1989) résultait d'un effet de compétition entre les deux enzymes.

Ainsi, parallèlement à l'augmentation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V observée par Dennis et al. (1989) dans des fibroblastes Rat2 transformés par l'oncogène humain c-Ha-ras, nous avons pu montrer que l'expression de ce même oncogène dans une lignée fibroblastique de Souris, induit une faible diminution de l'activité de l' α 2,3ST(N/O) mais de manière plus significative une augmentation d'un facteur 1,4 à 1,8 de l'activité de l' α 2,6ST(N). Considérés ensembles, ces résultats indiquent que l'oncogène humain c-Ha-ras a une action spécifique sur les systèmes enzymatiques intervenant dans la

glycosylation des N-glycosylprotéines et, d'autre part, que ces effets sembleraient se traduire différemment selon le modèle cellulaire considéré.

Les travaux de Easton et al. (1991) ont effectivement permis de conforter l'influence de l'expression transformante des gènes de la famille ras sur la synthèse des structures N-glycosidiques. En comparant l'activité des différentes glycosyltransférases responsables de la N-glycosylation des glycoprotéines de cellules NIH3T3 normales et de ces cellules contenant le proto-oncogène cellulaire N-ras placé sous le contrôle du promoteur MMTV-LTR inductible par les glucocorticoïdes, ces auteurs ont montré que la surexpression transformante de ce gène altérait de manière différente l'activité de certains de ces enzymes. Ces observations leur ont permis de conclure que la combinaison des différentes modifications dans l'expression de ces enzymes par les gènes ras allait dans le sens d'une augmentation de la sialylation, d'une augmentation du nombre et de la longueur des chaînes poly-N-acétyllactosaminiques et d'une augmentation de l'antennarisation des glycanes de type N-glycosidiques.

Néanmoins, les gènes ras, ne contenant pas d'information génétique directement dirigée vers ces systèmes de glycosylation, ceux-ci ne peuvent modifier la glycosylation de surface qu'en interférant avec les enzymes de la cellule hôte et, plus probablement, en intervenant de manière directe ou indirecte par l'intermédiaire de la protéine p21, dans la régulation génique de ces glycosyltransférases. En particulier, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) le gène ras active l' α 2,6ST(N) est encore inconnu. Mais depuis qu'il a été montré que les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone induisaient l'expression de cet enzyme dans le foie de Rat (Wang et al., 1989), nous pouvons penser que l'augmentation

similaire de l'activité de l' α 2,6ST(N) que nous avons observé pourrait éventuellement refléter un effet "glucocorticoïd-like" de l'oncogène ras.

Afin de tenter de vérifier cette hypothèse, nous avons ultérieurement étudié l'effet de la dexaméthasone sur les activités sialyltransférasiques des fibroblastes. Pour ces études, nous avons utilisé un autre modèle cellulaire disponible au laboratoire : les fibroblastes de Rat Fischer (FR3T3). D'après certains résultats obtenus au laboratoire (Le Marer et al., 1992), ce modèle nous semblait être plus avantageux que les cellules NIH3T3 car présentant une induction beaucoup plus marquée de l'activité de l' α 2,6ST(N) après transformation par l'oncogène ras.

INDUCTION PAR LA DEXAMETHASONE DE LA TRANSCRIPTION DE LA
 β -GALACTOSIDE α -2,6-SIALYLTRANSFERASE DE FIBROBLASTES
DE RAT.

I - INTRODUCTION.

La réponse inflammatoire aiguë caractérise la réaction d'un organisme à des perturbations de l'homéostasie en conséquence d'une infection, d'une lésion tissulaire ou de désordres immunologiques. De fait, il s'agit principalement d'une réponse systématique du foie à l'inflammation, entraînant d'importants et rapides changements du métabolisme de l'hôte en vue de rétablir l'homéostasie. Ainsi, sous l'effet des glucocorticoïdes, des interleukines et des cytokines, libérés massivement dans la circulation sanguine lors de l'inflammation, la synthèse hépatique de certaines protéines, appelées "acute-phase reactants" sera modifiée. En particulier, il a pu être décrit, aussi bien chez l'Homme que chez des animaux d'expérience, une augmentation du taux de sécrétion par les hépatocytes, d'une grande variété de glycoprotéines sériques, telles que l'orosomucoïde et le fibrinogène (Kushner & Mackiewicz, 1987).

Depuis qu'il a été observé que l'activité de l' $\alpha_2,6$ ST(N) était augmentée dans le foie et le sérum de Rat lors de la réponse inflammatoire (Kaplan et al., 1983) et que, d'autre part, cette activité sérique résultait d'une augmentation de la sécrétion par les hépatocytes d'une forme soluble et catalytiquement active de l'enzyme, il a été proposé que l' $\alpha_2,6$ ST(N) puisse également faire partie des "acute-phase reactants". Cette hypothèse a été confirmée par Wang et al. qui ont observé que le traitement de cellules hépatiques de Rat par la dexaméthasone induisait une augmentation de l'activité $\alpha_2,6$ -sialyltransférase (Wang et al., 1989) due à une augmentation de taux de transcription de l'enzyme (Wang et al., 1990b) spécifiquement inductible par les glucocorticoïdes.

De la même manière, nous avons pu caractériser une augmentation de l'activité de cette enzyme dans une lignée fibroblastique de Rat

après traitement par la dexaméthasone. Cette induction, spécifique de la voie des récepteurs des glucocorticoïdes, est la conséquence directe d'une augmentation du taux de transcription d'un ARNm de 4,7 kb et conduit à une augmentation de la sialylation des glycoprotéines cellulaires.

Le mémoire suivant rapporte l'essentiel des résultats que nous avons obtenus. Il a été publié en 1993 dans European Journal of Biochemistry .

II - PUBLICATION.

Transcriptional induction of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone

Valérie VANDAMME, Annick PIERCE, André VERBERT and Philippe DELANNOY

Laboratoire de Chimie Biologique (UMR n° 111 du Centre National de la Recherche Scientifique),
Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

(Received June 29 September 14, 1992) – EJB 92 0894

The β -galactoside α -2,6-sialyltransferase activity of Fisher rat fibroblasts is enhanced by dexamethasone while the activity of the β -galactoside α -2,3-sialyltransferase remains unchanged. This glucocorticoid-dependent activation can be inhibited by the antagonist RU 38.486 and results from an elevated transcription rate of the 4.7-kb mRNA previously characterized in rat fibroblasts, distinct from the 4.3-kb liver-restricted mRNA. As shown by the binding of radiolabelled *Sambucus nigra* agglutinin, this activation leads to an increase of NeuNAc(α 2-6)Gal sequences on glycoproteins isolated from the dexamethasone-treated cells.

It is now well documented that the glycan moieties of glycoconjugates play an important part in the biological roles of these molecules, for instance in recognition phenomena such as protein targeting [1] or cell-cell interactions [2, 3] and that *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid) residues are involved in adhesion, mobility and recognition of cells [4–6]. In particular, some adhesion molecules specifically recognize sialoglycoconjugates [7–9] and the role of lectin/glycan interactions in the early stage of monocyte/endothelial-cell interactions has been clearly demonstrated during inflammation [5].

The structures of the glycans are greatly diversified and often specific for tissues, species or cells [10] and may be modified according to physiological [11] or pathological states [12, 13]. For example, malignant cells express a larger amount of multiantennary and more sialylated *N*-linked glycans than do their normal counterparts [14, 15]. Since the oligosaccharide chains are synthesized in the Golgi apparatus by specific glycosyltransferases, the appearance of a certain glycan requires the expression of these glycosyltransferases. These could be modulated by intracellular and/or extracellular signals.

Glucocorticoids interact via the glucocorticoid-receptor pathway with a large number of cells including fibroblastic cells [16] and the binding of the hormone/receptor complex to specific DNA-response elements leads to an enhancement or an inhibition of the transcription of some related genes. Dur-

ing the acute-phase response of the liver to tissue injury, an elevation of sialyltransferase activity has been observed in the liver and serum [17]. The β -galactoside α -2,6-sialyltransferase (α -2,6-sialyltransferase) transfers sialic acid residues from CMP-NeuNAc onto non-reducing terminal *N*-acetylglucosamine sequences of *N*-linked glycans [18] and recent reports have shown that the dexamethasone-induced increase of this activity in the liver [19] results from an elevation of the transcriptional rate of this enzyme [20].

Here, we describe a similar enhancement of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase activity in Fisher rat fibroblasts (FR3-T3 cells) cultured in the presence of dexamethasone and we show that the activity of other sialyltransferases is not modified. In addition, we demonstrate that this effect, which is directly dependent on the glucocorticoid-receptor pathway, is achieved by an increase in the amount of the 4.7-kb mRNA encoding this enzyme in FR3T3 cells and leads to enhancement of the sialylation of cell glycoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Materials

CMP-[¹⁴C]NeuNAc (262 mCi mmol; 4.37 GBq:mmol) and ¹²⁵I-IMS 30 (iodide, carrier free, 100 mCi ml; 3.7 GBq ml) were from Amersham Labs (Amersham). CMP-NeuNAc, 2,3-dehydro-2-deoxy-NeuNAc, dexamethasone and fetuin were purchased from Sigma Chem. Co. and Iodo-Gen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycoluril) was from Pierce. Fetuin and α ₁-acid-glycoprotein (purified from human serum [21]) were desialylated by mild acid hydrolysis with 0.05 M H₂SO₄ at 80 °C for 1 h. *Sambucus nigra* agglutinin was obtained from Boehringer. The oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc [22] was the gift of Drs Gérard Strecker and Jean Claude Michalski (Villeneuve d'Ascq, France). RU 38.486 was the gift of Roussel-Uclaf Research Center. The cDNA encoding rat β -galactoside

Correspondence to P. Delannoy, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Abbreviations. α -2,3-sialyltransferase, CMP-*N*-acetylneuraminic acid-Gal(β 1-3-4)GlcNAc α -2,3-sialyltransferase; α -2,6-sialyltransferase, CMP-*N*-acetylneuraminic acid-Gal(β 1-4)GlcNAc α -2,6-sialyltransferase; FR3T3, Fisher rat fibroblast; GRE, glucocorticoid-response element.

Enzymes. CMP-*N*-acetylneuraminic acid-Gal(β 1-4)GlcNAc α -2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.1); CMP-*N*-acetylneuraminic acid-Gal(β 1-3-4)GlcNAc α -2,3-sialyltransferase (EC 2.4.99.6).

α -2,6-sialyltransferase was a generous gift of James C. Paulson (Cytel Corp.).

Cell culture and sialyltransferase assays

FR3T3 cells [23] were grown in Dulbecco's modified Eagle medium with 10% foetal calf serum and antibiotics. Dexamethasone or RU 38.486 were added 24 h after the last passage and cells were harvested 48 h later and washed in NaCl/P_i (sodium phosphate 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4). Cells were lysed at 0 °C with 1 ml/flask (170 cm²) of 10 mM sodium cacodylate, pH 6.5, containing 1% Triton X-100, 20% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol and 5 mM MnCl₂. After 10 min of incubation, cell homogenates were prepared by centrifugation at 10000 g for 15 min and the protein concentration was determined using a modified Lowry method [24]. Protein contents of control or dexamethasone-treated cells were 3–4 mg/ml. Incubations were performed for 1–4 h at 37 °C in a final volume of 120 μ l under the following conditions: 40 μ l cell homogenate, 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 1% Triton X-100, 0.1% bovine serum albumin, 0.2 M Gal, 1 mM 2,3-dehydro-2-deoxy-NeuNAc, 52.9 μ M CMP-[¹⁴C]NeuNAc (0.58 GBq/mmol, 3.67 kBq/120 μ l) and 25 μ l exogenous acceptor at a concentration calculated to obtain 1.6 mM terminal Gal residues [25]. The incorporation into endogenous substrates was negligible under these conditions. The amount of incorporation was assayed as follows. In the case of asialo-fetuin and asialo- α ₁-acid glycoprotein, the reaction was stopped by addition of 1 ml ice-cold 5% phosphotungstic acid in 2 M HCl. The precipitate was collected on a glass-fiber filter and washed extensively with 5% trichloroacetic acid, then with distilled water and ethanol and processed for scintillation counting. Otherwise, the reaction was stopped by boiling samples for 10 min in order to completely release NeuNAc from unreacted CMP-NeuNAc. Samples were centrifuged at 3000 g for 5 min and directly processed for descending paper chromatography using the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3 by vol.).

Release of [¹⁴C]NeuNAc-labelled glycans from asialofetuin

Asialo-fetuin was incubated under standard conditions of sialyltransferase assay. Aliquots of each incubation mixture were assayed for incorporation of [¹⁴C]NeuNAc as described above. The glycoprotein was separated from CMP-[¹⁴C]NeuNAc and [¹⁴C]NeuNAc by desalting on Bio-Gel P2 column (200–400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate, pH 5.6, and glycans released by alkaline treatment under reducing conditions in 0.1 M NaOH containing 1 M NaBH₄ for 48 h at 45 °C [26]. At the end of the incubation, samples were acidified to pH 6 by addition of Dowex 50 \times 8 (H⁺ form, 20–50 mesh) and evaporated. They were dissolved in methanol and evaporated three times, then dissolved in water and applied to a previously calibrated Bio-Gel P4 column (100 cm \times 1.6 cm, 200–400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate, pH 5.6 [25].

RNA analysis

Extraction of RNA was performed using the guanidium thiocyanate cesium chloride method [27]. The amounts of RNA extracted from a 70-cm² flask of cells were as followed: control FR3T3, 190 μ g; RU 38.486-treated cells, 200 μ g; dexamethasone-treated cells without or supplemented with

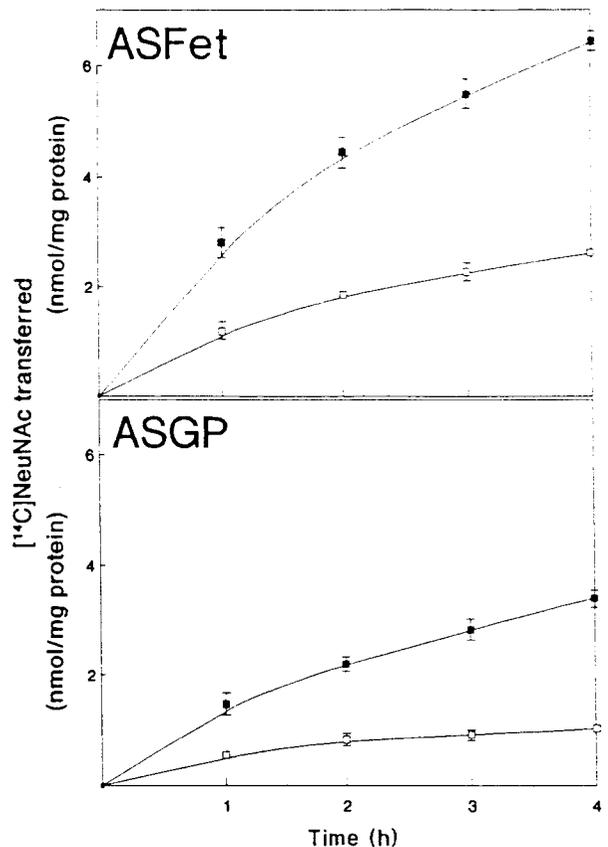


Fig. 1. Effect of dexamethasone on the transfer of NeuNAc. Homogenates of cells cultured with or without 1 μ M dexamethasone were incubated with asialofetuin (ASFet) or asialo- α ₁-acid glycoprotein (ASGP) as described in Materials and Methods. Results are mean values of three separate experiments. (\square), Control; (\blacksquare), dexamethasone-treated cells.

100 nM and 1 μ M RU 38.486, respectively 180, 182 and 194 μ g. Northern-blot experiments were performed using classical procedures with 40 μ g total RNA/lane. The 1.6-kbp insert of the plasmid pECE-ST3 [28] and mouse β -actin cDNA probe were radiolabelled using the multi-prime kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturers instructions. Slot blots were performed using Bio-Dot SF microfiltration apparatus using 30 μ g total RNA/well, according to standard procedures [27]. The relative sialyltransferase signals were quantified by densitometric scanning of the autoradiographs.

Electrophoresis and glycoprotein staining

SDS/PAGE was performed on 5–24% gradient gels under reducing conditions using 50 μ g protein from cells treated or not with 1 μ M dexamethasone and with various concentrations of RU 38.486. *S. nigra* agglutinin was radiolabelled by the Iodo-Gen method [29]. Western blotting on nitrocellulose membranes was performed using standard procedures [30]. Blots were incubated with the iodinated lectin [10⁶ dpm/ml in NaCl/P_i, 2% poly(vinylpyrrolidone)] for 4 h.

RESULTS

Enhancement of α -2,6-sialyltransferase activity in FR3T3 cells by dexamethasone

After 48 h of culture with 1 μ M dexamethasone, cells were assayed for sialyltransferase activities. As indicated in Fig. 1.

Table 1. Analysis of the sialylation products of asialo-fetuin. Homogenates of cells cultured with or without 1 μ M dexamethasone (Dex) were incubated with asialofetuin and the 14 C-labelled glycans were analyzed as described in Materials and Methods.

Product	Activity		Dex control activity ratio
	control	1 μ M dex	
	nmol \cdot mg $^{-1}$ \cdot h $^{-1}$		
N-Glycans	0.20	0.86	4.23
O-Glycans	0.92	1.44	1.56

the treatment of FR3T3 cells with 1 μ M dexamethasone resulted in an increased transfer of [14 C]NeuNAc onto asialofetuin (2.4 \pm 0.05-fold) or asialo- α_1 -acid glycoprotein (2.95 \pm 0.35-fold). Incubations were performed with a large excess of acceptors (1.6 mM theoretical acceptor sites), about a 30-fold higher concentration than that of CMP-[14 C]NeuNAc. Under these conditions, the acceptor cannot at any stage be saturated. Furthermore, after 4 h incubation, a maximum of 15% of [14 C]NeuNAc was transferred from CMP-[14 C]NeuNAc onto the acceptor and the amount of CMP-[14 C]NeuNAc cannot, therefore, be a limiting factor.

As asialo-fetuin contains three tri-antennary complex-type glycans and three O-linked oligosaccharides, mainly Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-0)Ser [31] and may be used as an acceptor by the different sialyltransferases acting on N-linked or O-linked glycans, we have analyzed the sialylation products of asialofetuin incubated with extracts from control and dexamethasone-treated cells. After separation by gel permeation of β -eliminated [14 C]NeuNAc-labelled O-glycans from [14 C]NeuNAc-labelled N-glycosylpeptides [25], we observed (Table 1) that dexamethasone enhanced (4.2-fold) the transfer of sialic acid residues onto the N-glycans of asialo-fetuin. Transfer onto the O-linked chains was also increased but at a lower level (1.5-fold) than for N-linked glycans. In both cases, the O-glycan fraction was identified by HPLC [32] as the monosialylated oligosaccharide Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc-ol (data not shown).

Two sialyltransferases are responsible for the sialylation of complex-type N-linked chains: CMP-N-acetylneuraminyl-Gal(β 1-4)GlcNAc α -2,6-sialyltransferase and CMP-N-acetylneuraminyl-Gal(β 1-3,4)GlcNAc α -2,3-sialyltransferase (α -2,3-sialyltransferase). Using the oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc as an acceptor in the sialylation reaction, we were able to determine the influence of dexamethasone on the activity of both enzymes by separating and quantifying the sialylated isomers. Fig. 2 indicates that 1 μ M dexamethasone led to a 6.5-fold higher amount of the α -2,6-isomer in this assay whereas the amount of the α -2,3-isomer remained unchanged. Additionally, in order to verify that this induction was via the glucocorticoid-receptor pathway and not an artefact due to the detergent-like properties of dexamethasone, cells were also cultured with the glucocorticoid antagonist RU 38.486 to block the glucocorticoid action by competitive receptor binding [33, 34]. As shown in Fig. 2, 1 μ M RU 38.486 did not depress the basal level of the α -2,6-isomer in the absence of dexamethasone but the induction of the formation of the α -2,6-isomer by 1 μ M dexamethasone was reduced by 0.15, 73 and 83% in the presence of 10 nM, 100 nM, 1 μ M and 2 μ M

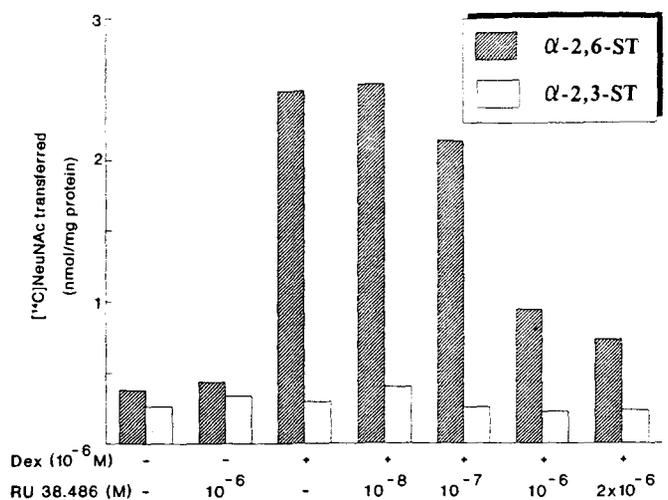


Fig. 2. Effect of dexamethasone on α -2,3-sialyltransferase and α -2,6-sialyltransferase. Homogenates of cells cultured with or without 1 μ M dexamethasone (Dex) and with RU 38.486 at the indicated concentrations were incubated 4 h with the oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc. The α -2,3-sialyltransferase (α -2,3-ST) and the α -2,6-sialyltransferase (α -2,6-ST) activities were quantified as described in Materials and Methods.

RU 38.486, respectively. These data demonstrate that the observed elevation in sialyltransferase activity with the asialoglycoproteins is mainly, if not completely, due to the specific enhancement of α -2,6-sialyltransferase activity by dexamethasone.

Dexamethasone increases the synthesis of α -2,6-sialyltransferase mRNA in FR3T3 cells

A Northern-blot experiment was carried out by hybridizing a 32 P-labelled α -2,6-sialyltransferase cDNA probe with 40 μ g total cellular RNA, isolated from cells treated with dexamethasone and with RU 38.486. Fig. 3 shows that, in dexamethasone-treated cells the amount of α -2,6-sialyltransferase mRNA was significantly increased compared to controls and that the signal decreased with addition of RU 38.486. This clearly indicates that the increase of the α -2,6-sialyltransferase activity is associated with a higher amount of the corresponding mRNA, suggesting a transcriptional induction involving the glucocorticoid-receptor pathway in FR3T3 cells. In addition, only a 4.7-kb RNA is produced in FR3T3 cells [35] and the expression of the 4.3-kb liver-restricted mRNA is not induced in dexamethasone-treated cells. Both of these mRNA have been shown to be transcribed from the same gene but arise by alternative promoter usage [36, 37].

To determine if dexamethasone enhances α -2,6-sialyltransferase expression either by increasing mRNA stability or by an activation of the synthesis of α -2,6-sialyltransferase mRNA, after treatment with 1 μ M dexamethasone for 48 h, cells were exposed to 10 μ g/ml actinomycin D for up to 30 h to inhibit further mRNA synthesis. Fig. 4 shows the remaining α -2,6-sialyltransferase mRNA in control and dexamethasone-treated cells by hybridizing RNA slot-blots with the α -2,6-sialyltransferase cDNA probe. The kinetics of degradation of the transcripts appeared to be identical in both cells without stabilisation of α -2,6-sialyltransferase mRNA in dexamethasone-treated cells. 50% of degradation was obtained after 12 h of exposure to actinomycin D. These data indicated that dexamethasone-mediated induction of α -2,6-sialyl-

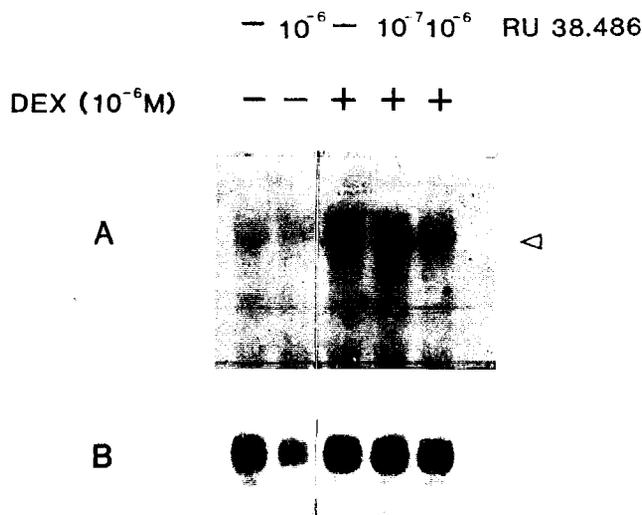


Fig. 3. Effect of dexamethasone and RU 38.486 on the expression of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase mRNA. Total mRNA was extracted from cells cultured with or without 1 μ M dexamethasone (Dex) and with RU 38.486 at the indicated concentrations and hybridized with the α -2,6-sialyltransferase cDNA probe (A) or with β -actin cDNA (B). (\triangle), The position of the 4.7-kb transcript from rat spleen used as marker. The lower signal of α -2,6-sialyltransferase mRNA in the second lane from the left compared to the first lane, is explained by a lower amount of total RNA as testified the decreased β -actin signal.

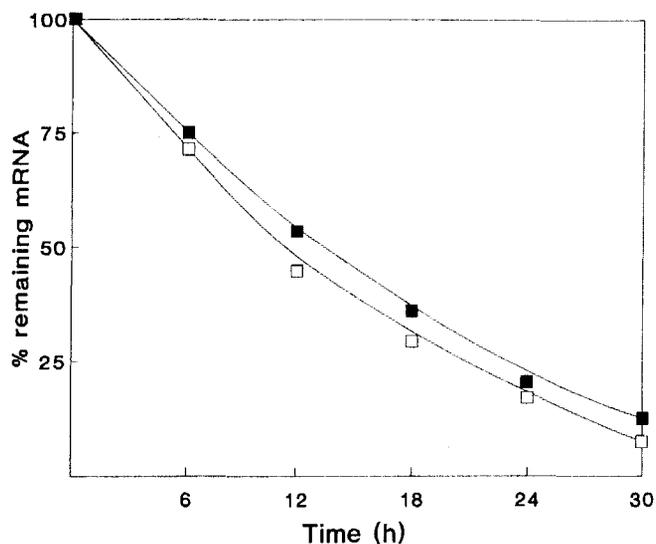


Fig. 4. Effect of dexamethasone on the stability of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase mRNA in FR3T3 cells. The stability of α -2,6-sialyltransferase mRNA of FR3T3 treated with 1 μ M dexamethasone was compared with control cells. After 48 h of exposure, the culture media were supplemented with 10 μ g/ml actinomycin D to inhibit further mRNA synthesis for up to 30 h. 30 μ g total RNA prepared from cells at various times were slot-blotted onto nitrocellulose membrane and probed using α -2,6-sialyltransferase cDNA. The sialyltransferase signals were quantified from the autoradiographs by densitometric scanning. Results are expressed as the percentage of remaining mRNA (100% representing the level of mRNA in the absence of actinomycin-D). (□), Control; (■), dexamethasone-treated cells.

transferase is achieved through an enhancement of the synthesis of mRNA rather than by a change in mRNA stability which is consistent with a glucocorticoid-dependent activation of the promoter for the 4.7-kb mRNA.

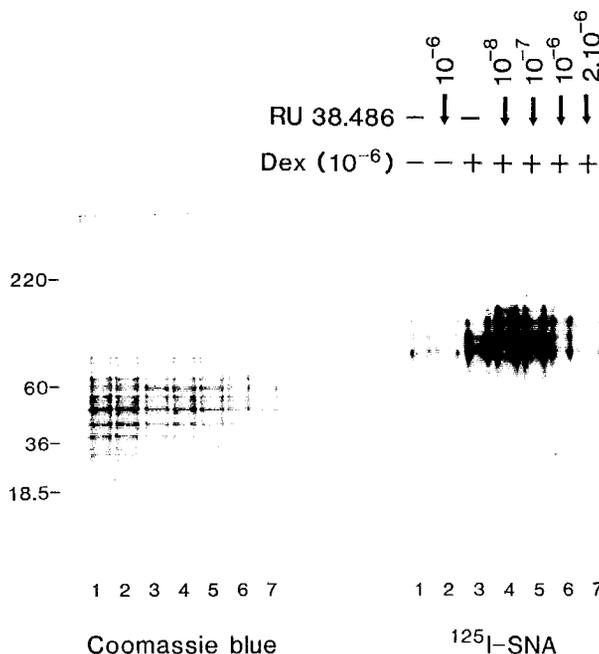


Fig. 5. Lectin blot of glycoproteins from FR3T3 treated with 1 μ M dexamethasone and various concentrations of RU 38.486. 50 μ g protein were separated by SDS/PAGE and stained with Coomassie blue (A) and 125 I-*S. nigra* agglutinin (125 I-SNA) (B) after Western blotting. Lane 1, control cells; lane 2, cells cultured with 1 μ M RU 38.486; lanes 3–7, cells cultured with 1 μ M dexamethasone (Dex) and with various concentrations of RU 38.486: 0, 10 nM, 100 nM, 1 μ M and 2 μ M, respectively. The positions of standard proteins used as markers for molecular-mass estimation are indicated on the left in kDa.

The increased expression of α -2,6-sialyltransferase is correlated with changes in sialylation of cellular glycoproteins

S. nigra agglutinin is a lectin specific for NeuNAc(α -2-6)Gal/GalNAc sequences [38]. Fig. 5 shows that the binding of 125 I-*S. nigra* agglutinin to western blots of cell extracts was weak for control cells and for cells cultured with 1 μ M RU 38.486. In contrast, binding was stronger to glycoproteins from dexamethasone-treated cells, but decreased when RU 38.486 was used to inhibit the dexamethasone effect. This indicates that the expression of NeuNAc(α -2-6)Gal/GalNAc sequences on FR3T3 glycoproteins correlated with the increase of both the enzymic activity and the level of the α -2,6-sialyltransferase mRNA.

DISCUSSION

We have demonstrated that, as previously observed in hepatocytes [17, 19], the expression of the α -2,6-sialyltransferase in FR3T3 cells can be induced by glucocorticoids. However, recent reports showed that the rat α -2,6-sialyltransferase gene produces multiple transcripts which present striking tissue-specific expression [18, 36, 37, 39]. The 4.3-kb mRNA is specific to liver while 4.7-kb mRNA is found in most tissues [18, 37] and also in FR3T3 cells [35]. The 4.7-kb mRNA was found to be identical to 4.3-kb mRNA with two additional exons at the 5'-untranslated end of the transcript and therefore codes for the same polypeptide chain as the liver-specific mRNA [37]. The synthesis of the different mRNA appears to be controlled by separate promoters and the first additional exon of the 4.7-kb message has been found to be located 40-

kb upstream of the promoter controlling the production of the 4.3-kb mRNA [37]. Consequently, the glucocorticoid-dependent induction of the 4.3-kb and 4.7-kb α -2,6-sialyltransferase mRNA is certainly achieved by separate glucocorticoid-response elements (GRE) [40] and there must be at least two independent dexamethasone-regulated promoters in this gene. The 4.3-kb mRNA is regulated by several liver-enriched transcription factors [41] but no GRE consensus sequence has been detected within 1 kb upstream of the transcriptional-start site of the 4.3-kb mRNA [36, 41]. According to the fact that GRE may reside outside the immediate promoter region [42], further investigations upstream and/or downstream of the immediate promoter regions of the 4.3-kb and 4.7-kb transcripts are necessary to locate GRE responsible for the induction of rat α -2,6-sialyltransferase. By contrast, the activity of the α -2,3-sialyltransferase is not modified by dexamethasone. This seems to indicate that the two sialyltransferases acting on complex-type N-glycan chains are regulated separately. In this context, it is important to note that dexamethasone has only a weak effect on the activity of α -2,6-sialyltransferase in mouse fibroblasts NIH3T3 [43]. This would indicate that the effect of dexamethasone on the activity of α -2,6-sialyltransferase is species specific.

As indicated by the binding of *S. nigra* agglutinin, the increased expression of α -2,6-sialyltransferase is accompanied by an important modification in the sialylation of cellular glycoproteins of FR3T3 treated with dexamethasone. Alterations of the N-linked glycan terminal sequences of glycoproteins have been previously reported after transfection of rat α -2,6-sialyltransferase in chinese hamster ovary cells [28] and we have recently demonstrated that the c-Ha-ras oncogene induces increased expression of α -2,6-sialyltransferase in FR3T3 cells, resulting in an increased amount of α -2,6-linked sialic acid residues on cell-surface glycoconjugates [35]. These different observations give evidence for a transcriptional regulation of cellular glycoprotein processing and indicate that the overexpression of the α -2,6-sialyltransferase can modify the terminal carbohydrate structures *in vivo* and competes with the enzymes normally present in the cells. This is consistent with a recent report which demonstrates that the expression of the X determinant in human myeloid cells is partially regulated by the expression of α -2,6-sialyltransferase [44] and with the report that the expression of α -2,6-sialyltransferase regulates the appearance of several distinct cell-surface sialylated differentiation antigens of lymphocytes as CD75, CD76 and HB-6 [45]. This raises the question of the physiological consequence of the increase of α -2,6-linked sialic acid residues at the cell surface of fibroblastic cells after glucocorticoid treatment.

We thank Drs Gérard Strecker and Jean Claude Michalski (Villeneuve d'Ascq, France) for generous gift of the oligosaccharide and Prof. James C. Paulson (Cytel Corp., San Diego, USA) for the gift of the α -2,6-sialyltransferase cDNA probe. We are also grateful to Dr Ian Cornelis (Institut Pasteur, Lille, France) for giving us FR3T3 cells and to Dr Sorge Kelm (University of Kiel, Germany) and Dr Raymond Pierce (Institut Pasteur, Lille, France) for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n° 111) and the Université des Sciences et Technologies de Lille. We acknowledge the technical assistance of Monique Benaïssa and Odette Labiau.

REFERENCES

1. Kornfeld, S. (1987) *FASEB J.* 1, 462–468.
2. Sharon, N. L. & Lis, H. (1989) *Science* 246, 227–234.
3. Stoolman, L. M. (1989) *Cell* 56, 907–910.
4. Ashwell, G. & Ashford, J. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 531–554.
5. Brandley, B. K., Swiedler, S. J. & Robbins, P. W. (1990) *Cell* 63, 861–863.
6. Paulson, J. C., Rogers, G. N., Carroll, S. M., Higa, H. H., Pritchett, T., Milks, G. & Sabesan, S. (1984) *Pure Appl. Chem.* 56, 797–805.
7. Springer, T. A. (1990) *Nature* 346, 425–434.
8. Springer, T. A. & Laskey, L. A. (1991) *Nature* 349, 196–197.
9. Crocker, P. R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., Mc Williams, A. S., Shotton, D. M., Paulson, J. C. & Gordon, S. (1991) *EMBO J.* 10, 1661–1669.
10. Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N. & Kobata, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3657–3663.
11. Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., Van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1985) *FEBS Lett.* 183, 65–69.
12. Van Beek, W. P., Smets, L. A. & Emmelot, P. (1975) *Nature* 253, 457–460.
13. Yamashita, K., Hitoi, A., Taniguchi, N., Yokosawa, N., Tsukada, Y. & Kobata, A. (1983) *Cancer Res.* 43, 5059–5063.
14. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. & Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10834–10840.
15. Montreuil, J., Debray, H., Debeire, P. & Delannoy, P. (1983) in *Structural carbohydrates in the liver* (Popper, M., Reutter, W., Köttgen, E. & Gudat, F., eds) pp. 239–258, MTP Press, Lancaster.
16. Forcica, M. A., Finlay, C. A. & Cristofalo, V. J. (1986) in *Biochemical actions of hormones* (Litwack, G., ed.) vol. 13, pp. 359–378, Academic press, New York.
17. Kaplan, H. A., Woloski, B. M. R. N. J., Hellmann, M. & Jamieson, J. C. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11505–11509.
18. Paulson, J. C., Weinstein, J. & Schauer, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10931–10934.
19. Wang, X. C., O'Hanlon, T. P. & Lau, L. T. Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1854–1859.
20. Wang, X. C., Smith, T. J. & Lau, J. T. Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17849–17853.
21. Schmid, K., Mc Nair, M. B. & Burgi, A. P. (1958) *J. Biol. Chem.* 230, 853–864.
22. Michalski, J. C., Strecker, G., Van Halbeek, H., Dorland, L. & Vliegthart, J. F. G. (1982) *Carbohydr. Res.* 100, 351–363.
23. Seif, R. & Cuzin, F. (1977) *J. Virol.* 24, 721–728.
24. Peterson, G. L. (1977) *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
25. Vandamme, V., Cazlaris, H., Le Marer, N., Laudet, V., Lagrou, C., Verbert, A. & Delannoy, P. (1992) *Biochimie (Paris)* 74, 89–100.
26. Carlson, D. M. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 616–626.
27. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
28. Lee, E. U., Roth, J. & Paulson, J. C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13848–13855.
29. Fraker, P. J. & Speck, J. C. Jr. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849–857.
30. Glass II, W. F., Briggs, R. C. & Hnilica, L. S. (1981) *Anal. Biochem.* 115, 219–224.
31. Nilsson, B., Norden, N. E. & Svensson, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4545–4553.
32. Bergh, M. L. E., Koppen, P. L. & Van den Eijnden, D. H. (1981) *Carbohydr. Res.* 94, 225–229.
33. Jung-Testas, I. & Baulieu, E. E. (1984) *J. Steroid Biochem.* 20, 301–306.
34. Moguilewsky, M. & Philibert, D. (1984) *J. Steroid Biochem.* 20, 271–276.
35. Le Marer, N., Laudet, V., Svensson, E. C., Cazlaris, H., Van Hille, B., Lagrou, C., Stéhelin, D., Montreuil, J., Verbert, A. & Delannoy, P. (1992) *Glycobiology* 2, 243–252.
36. Wang, X. C., O'Hanlon, T. P., Young, R. F. & Lau, J. T. Y. (1990) *Glycobiology* 1, 25–31.
37. Wen, D. X., Svensson, E. C. & Paulson, J. C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 2512–2518.

38. Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. & Peumans W. J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1596–1601.
39. O'Hanlon, T. P., Lau, K. M., Wang, X. C. & Lau, J. T. Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17389–17394.
40. Beato, M. (1989) *Cell* 56, 335–344.
41. Svensson, E. C., Conley, P. B. & Paulson, J. C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 3466–3472.
42. Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M. & Slater, E. P. (1989) *J. Steroid Biochem.* 32, 737–747.
43. Easton, E. W., Bolscher, J. G. M. & Van den Eijnden, D. H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 21674–21680.
44. Skacel, P. O., Edwards, A. J., Harrison, C. T. & Watkins, W. M. (1991) *Blood* 78, 1452–1460.
45. Bast, J. E. G., Zhou, L. J., Freeman, G. J., Colley, K. J., Ernst, T. J., Munro, J. M. & Tedder, T. F. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 423–435.

III - DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'étude des activités sialyltransférasiques des cellules FR3T3 traitées ou non par la dexaméthasone, nous a révélé que l'augmentation du transfert d'acide sialique que nous avons observée dans les cellules traitées par la dexaméthasone résultait d'un impact différentiel de ce glucocorticoïde sur les activités des différentes sialyltransférases responsables de la sialylation des glycoprotéines, ce qui est un argument supplémentaire montrant que ces enzymes sont régulés par des mécanismes différents.

L'analyse des glycopeptides néo-sialylés de l'asialo-fétuine a révélé que la sialylation du core 1 des O-glycannes résultant de l'activité de l' α 2,3ST(O) n'est que très faiblement augmentée (d'un facteur 1,5) après traitement des cellules par la dexaméthasone, alors que l'élévation du transfert de résidus d'acide sialique sur les extrémités terminales des structures N-glycosidiques est nettement plus marquée (d'un facteur 4,2), confirmant l'avantage de ce modèle cellulaire sur les fibroblastes murins utilisés précédemment.

Dans les tissus de Rat, la sialylation des structures N-glycosidiques est catalysée par deux enzymes, l' α 2,3ST(N/O) et l' α 2,6ST(N). Comme nous l'avons réalisé dans l'étude précédente, l'utilisation d'un accepteur commun à ces deux sialyltransférases nous a permis de définir l'effet de la dexaméthasone sur la nature de la sialylation. Alors que l'activité α 2,3-sialyltransférasique ne semble ne pas être affectée, nous avons démontré conformément aux résultats obtenus par Wang et al (1989) que l'activité de l' α 2,6ST(N) est très fortement induite (d'un facteur 6,5) par la dexaméthasone. D'autre part, cette induction diminue progressivement avec l'addition de concentrations croissantes de RU 38.486, inhibiteur compétitif des glucocorticoïdes. L'expression de ces

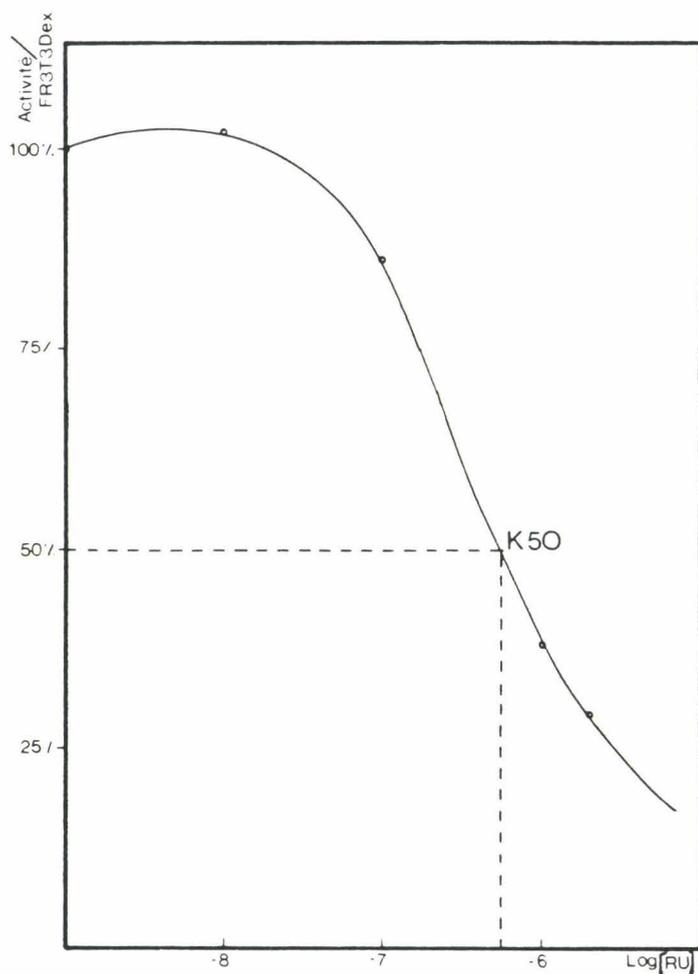


Figure 25 : Inhibition progressive par le RU 38.486 de l'induction de l'activité de l' $\alpha_2,6ST(N)$.

Les résultats obtenus dans la figure 2 de la publication sont exprimés ici sous la forme du rapport d'activité entre les cellules cultivées en présence de RU et de dexaméthasone et les cellules cultivées en présence de $1 \mu\text{M}$ de dexaméthasone en fonction du logarithme de la concentration en antagoniste. **K50** est la concentration en RU 38.486 nécessaire pour inhiber à 50% l'induction de l'activité de l'enzyme par la dexaméthasone. $K50 = 5,4 \times 10^{-7} \text{ M}$.

derniers résultats en taux d'activité α 2,6-sialyltransférase comparé aux cellules cultivées en présence de 1 μ M de dexaméthasone et en fonction du logarithme de la concentration en antagoniste (Fig.25, p.135) révèle que la concentration de $5,4 \times 10^{-7}$ M en RU 38.486 est suffisante pour inhiber à 50% cette induction, mais surtout que l'induction de l'activité α -2,6-sialyltransférase par la dexaméthasone est spécifique de la voie des récepteurs des glucocorticoïdes.

Enfin, nous avons pu montrer que l'augmentation de l'activité de l' α 2,6ST(N), corrélée avec l'élévation de la sialylation en liaison α 2,6 des glycoprotéines, résultait d'une augmentation de la quantité d'ARNm de 4,7 kb codant pour l'enzyme directement liée à une élévation du taux de transcription et non à une augmentation de la stabilité du transcrit.

Nos résultats sont tout à fait en accord avec une régulation du gène de l' α 2,6ST(N) par la voie des récepteurs des glucocorticoïdes proposée par Wang et al. (1990). Actuellement, nombre de gènes sensibles aux glucocorticoïdes ont été identifiés et le modèle d'action par lequel ces molécules régulent le taux de transcription et la quantité d'ARNm a pu être démontré. Le mode d'action établi actuellement propose que les récepteurs des glucocorticoïdes inactifs, présents dans le cytoplasme soient liés à des protéines hsp90. Lorsque les molécules de stéroïde pénètrent dans la cellule par diffusion passive au travers de la membrane, elles se fixent sur les récepteurs, induisant la dissociation des hsp90. Un complexe glucocorticoïde-récepteur ainsi activé va migrer dans le noyau où il se fixera sur des séquences spécifiques de l'ADN dans la région promotrice du gène cible, séquences appelées sites GRE. Le mécanisme par lequel la transcription est ensuite activée ou inhibée n'est pas connu mais il semble qu'il implique des interactions entre le

récepteur et d'autres facteurs de transcription ou la RNA polymérase II (revue de Venkatesh & Ballard, 1991).

Ainsi, au vu de nos résultats et de ceux obtenus par Wang et al. (1990), montrant que deux isoformes d'ARNm de 4,3 et de 4,7 kb, isoformes issues de l'utilisation de deux promoteurs différents, sont induites par les glucocorticoïdes, il semblerait que le gène de l' α 2,6ST(N) contienne au moins deux sites GRE différents. Toutefois aucune séquence consensus de ce type n'a pu être mise en évidence dans le promoteur de l'ARNm de 4,3 kb lors de l'étude de la région d'1 kb en amont du site d'initiation de transcription de ce transcrit hépatique. Il est donc possible que ces sites GRE soient localisés plus en amont et/ou en aval des régions promotrices des deux transcrits.

Un autre argument pourrait également expliquer le fait qu'aucun site GRE n'est pu être identifié dans ce promoteur, depuis la mise en évidence par Diamond et al. (1990) de l'existence d'une autre classe de séquences génomiques de fixation des récepteurs des glucocorticoïdes dans le promoteur de certains gènes. Ces séquences appelées "composite GRE" ne possèdent pas la séquence consensus identifiable GGTACAnnnTGTTCT des sites GRE.

Enfin, un des arguments qui nous a donné à penser qu'un tel site puisse être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de l' α 2,6ST(N) par les glucocorticoïdes, est que ces "composite GRE" nécessitent pour leur activité, non seulement la liaison du récepteur des glucocorticoïdes activé, mais aussi la fixation de facteurs de transcription de type non-récepteurs. Notamment, un de ces "composite GRE" possède des sites de liaison pour le récepteur des glucocorticoïdes et pour un autre facteur de transcription, le facteur AP-1 (activating protein 1) qui est un dimère composé des deux produits des oncogènes c-jun et c-fos. Or, il a été démontré préalablement que l'expression du gène c-Ha-ras est

capable d'induire l'expression de c-fos (Stacey et al., 1987) et également d'augmenter l'activité de c-jun en stimulant, par une cascade de phosphorylation impliquant différentes tyrosine-kinases, son domaine d'activation (Binétruy et al., 1991; Woodgett, 1992).

Certains résultats obtenus préalablement au laboratoire (Le Marer et al., 1992) ont permis de mettre en évidence une induction similaire par l'oncogène c-Ha-ras de l'activité de l' α 2,6ST(N) dans les fibroblastes FR3T3 liée à une augmentation du taux d'expression du transcrit de 4,7 kb. Ces données, confrontées à nos résultats, nous ont amenée à poser en hypothèse qu'il puisse exister un effet synergique entre l'effet de ras et la voie des récepteurs des glucocorticoïdes par l'intermédiaire de sites "composite GRE". Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes proposée ultérieurement, d'étudier l'effet de la dexaméthasone sur l'activité α -2,6-sialyltransférase des cellules FR3T3 transformées par l'oncogène ras, effet, qui dans l'hypothèse de l'existence de sites "composite GRE" dans le gène de l' α 2,6ST(N), devrait se traduire par une amplification de l'expression de cet enzyme déjà induite par la dexaméthasone dans les cellules FR3T3.

EFFET DE LA DEXAMETHASONE SUR LES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES
DES CELLULES FR3T3 TRANSFORMEES PAR TRANSFECTION
DE L'ONCOGENE HUMAIN c-Ha-ras.

I - INTRODUCTION.

Des études antérieures effectuées au laboratoire ont permis de montrer que la lignée de cellules transformées FRras, obtenue par transfection de fibroblastes de Rat Fischer FR3T3 par le plasmide pSV2neo-EJ contenant l'oncogène c-Ha-ras isolé d'un carcinome humain de la vessie (Tabin et al., 1982), présentait une activité α 2,6-sialyltransférasique 8 à 10 fois supérieure aux cellules de la lignée parentale (Le Marer et al., 1992). Cette induction, qui n'est pas liée au phénotype transformé des cellules mais qui résulte d'un effet spécifique de la protéine p21ras oncogénique, a pu être corrélée avec une augmentation de la quantité d'un ARNm de 4,7 kb codant pour cet enzyme (Le Marer et al., 1992).

L'induction similaire que nous avons observée après traitement des cellules FR3T3 par la dexaméthasone et qui s'est révélée être la conséquence d'une augmentation de la transcription du même messager, nous a amenée à penser que l'expression de l'oncogène humain c-Ha-ras dans cette lignée de fibroblastes de Rat pouvait avoir un effet synergique ou compétitif avec la voie des récepteurs des glucocorticoïdes, selon un mécanisme de régulation transcriptionnelle par les glucocorticoïdes similaire à celui décrit pour le gène de la proliférine et impliquant une co-fixation d'un complexe AP-1 et d'un récepteur activé sur un site "composite GRE" (Diamond et al., 1991). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de la dexaméthasone sur les activités sialyltransférasiques des cellules transformées par l'oncogène ras et également comparé l'effet de ces deux systèmes inducteurs, dexaméthasone et expression de l'oncogène ras, sur l'expression et la transcription de l' α 2,6ST(N).

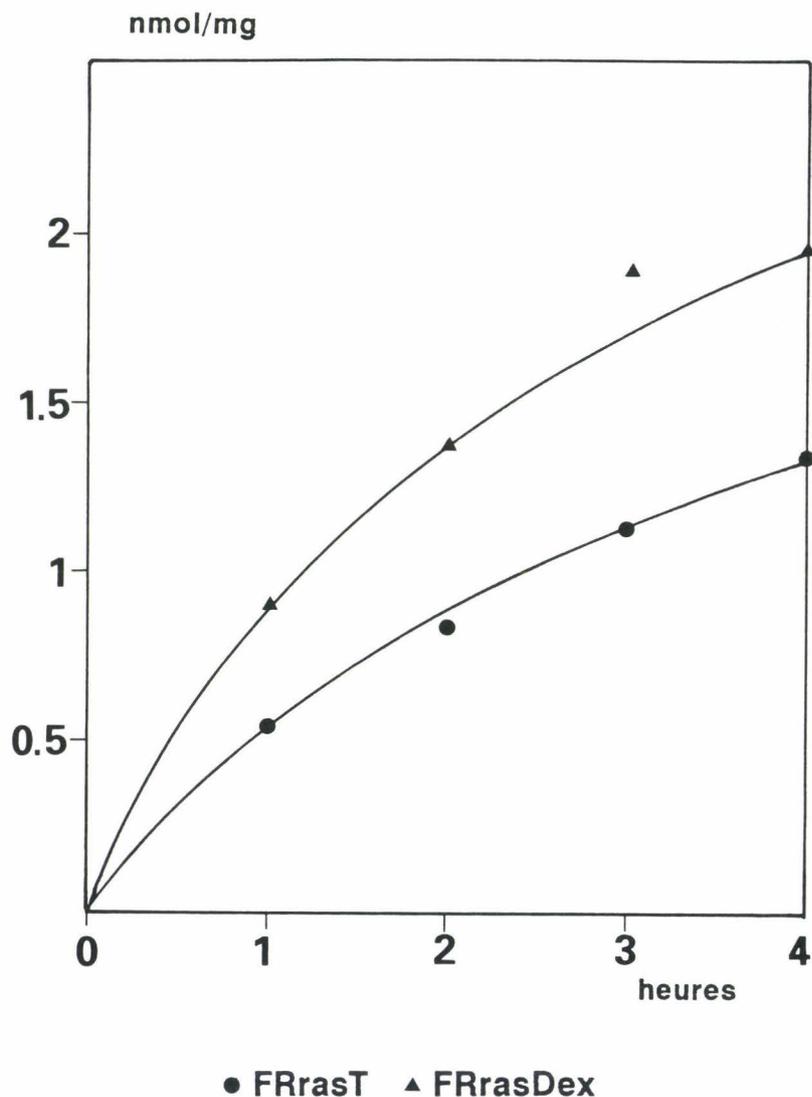


Figure 26 : Effet de la dexaméthasone sur la cinétique de transfert d'acide sialique des cellules FRras vis-à-vis de l'asialo-orosomucoïde (ASOR).

Les homogénats des cellules cultivées ou non en présence de 1 μ M de dexaméthasone ont été incubées avec l'ASOR (à une concentration finale de 1,6 mM en résidus de Gal terminaux) dans les conditions standard décrites dans l'appendice technique. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne de trois expériences.

II - RESULTATS.

A - 1^{ère} partie : Effet de la dexaméthasone sur l'expression de l' α 2,6ST(N) des cellules FRras.

1 - Comparaison des activités sialyltransférasiques des cellules FRras et FRrasDex vis-à-vis de l'asialo-orosomucoïde.

Après culture des cellules 48 h en présence de 1 μ M de dexaméthasone, nous avons comparé les capacités de transfert de résidus d'acide sialique des homogénats de cellules FRras avec les cellules non traitées en utilisant l'asialo-orosomucoïde comme accepteur glycoprotéinique. Comme le montre la figure 26 (p.141), la comparaison des cinétiques obtenues nous a permis d'observer que le traitement des cellules transformées FRras par 1 μ M de dexaméthasone n'induisait qu'une très faible augmentation des activités sialyltransférasiques vis-à-vis de l'asialo-orosomucoïde (d'un facteur $1,56 \pm 0,07$), comparée à l'induction préalablement observée pour les cellules normales FR3T3.

En se basant sur le fait que l'asialo-orosomucoïde ne possède que des structures N-acétyllactosaminiques de type tri- et tétra-antenné (Fournet et al., 1978), nous avons poursuivi cette étude en utilisant la structure oligosaccharidique Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)-GlcNAc comme accepteur dans la réaction de sialylation, ceci afin de déterminer si conformément aux résultats décrits dans la publication précédente, seule l'activité de l' α 2,6ST(N) était induite par la dexaméthasone dans les cellules FRras.

2 - Effet de la dexaméthasone sur l'activité de l' α 2,6ST(N) et de l' α 2,3ST(N/O) des cellules FRras.

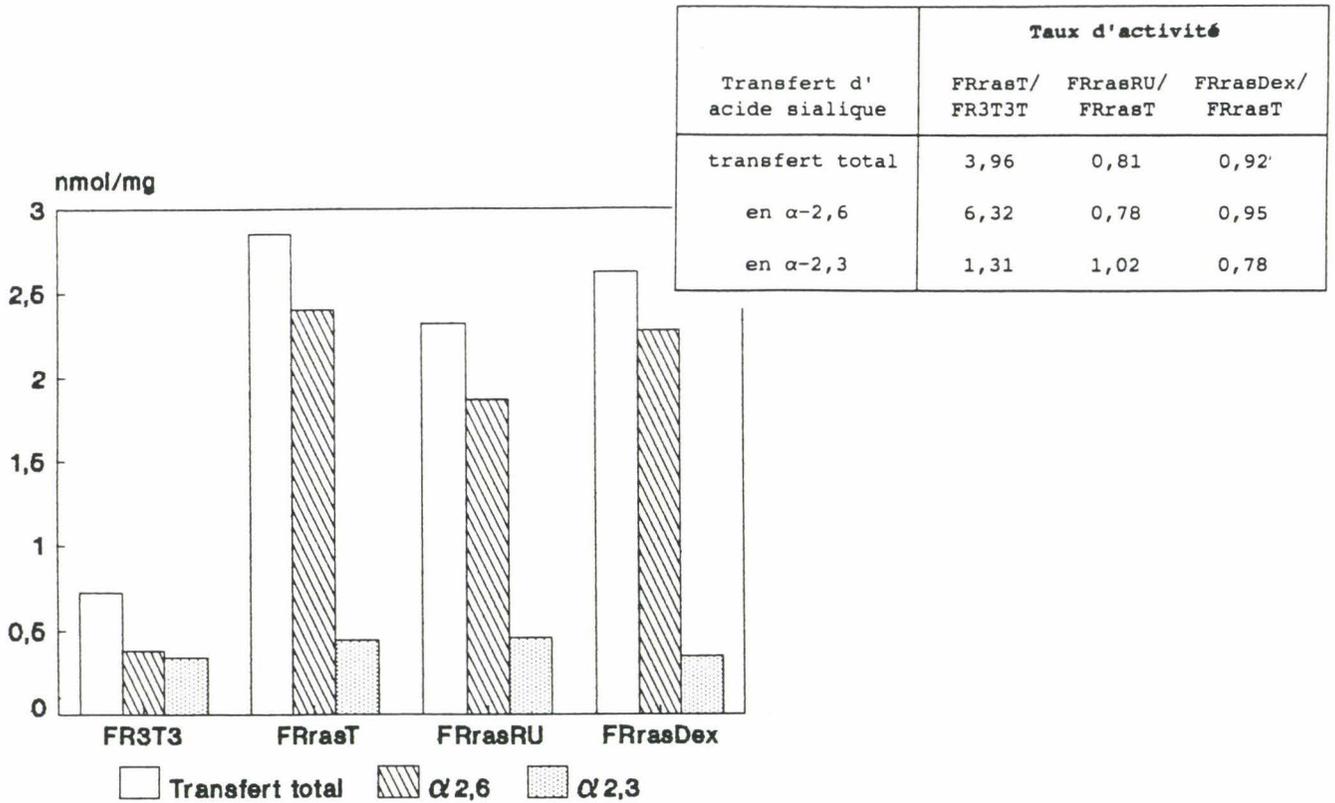


Figure 27 : Effet de la dexaméthasone sur les activités α 2,3- et α 2,6-sialyltransférasiques des cellules FRras.

Les homogénats des cellules FRras cultivées ou non en présence de 1 μ M de dexaméthasone ou de 2 μ M de RU 38.486 sont incubés pendant 4 h avec l'oligosaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc. La séparation et la quantification des isomères de sialylation sont décrites dans l'appendice technique.

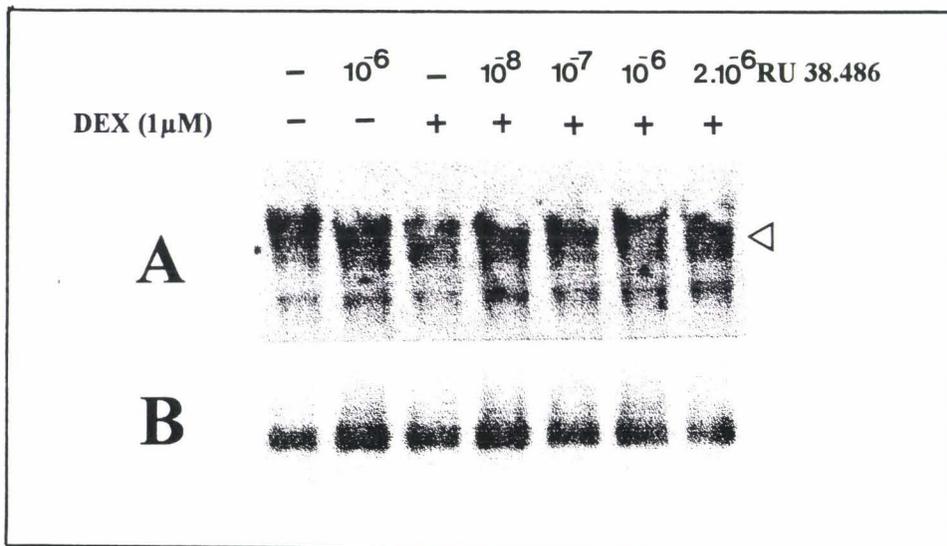


Figure 28 : Effet de la dexaméthasone et du RU 38.486 sur l'expression de l'ARNm codant pour l' α -2,6-sialyltransférase dans les cellules FRras.

Les ARN totaux ont été extraits des cellules cultivées en présence ou non de 1 μ M de dexaméthasone (Dex) et de RU 38.486 aux concentrations indiquées et hybridés avec l'ADNc de l' α 2,6ST(N) (A) ou l'ADNc de la β -actine de Rat (B). (\triangleright), correspond à la position du transcrite de 4,7 kb de rate de Rat utilisé comme témoin de masse moléculaire.

Après incubation des homogénats cellulaires pendant 4 heures en présence de cet accepteur dans les conditions standard et après séparation et quantification des isomères de sialylation, nous avons pu déterminer l'influence de la dexaméthasone sur l'activité de l' α 2,6ST(N) et de l' α 2,3ST(N/O) des cellules FRras.

La figure 27 (p.143) montre que le traitement des cellules FRras par la dexaméthasone se traduit, d'une part, par une très faible diminution (d'un facteur 1,28) de l'activité de l' α 2,3ST(N/O), et d'autre part, ne modifie pas la sialylation en liaison α 2,6. La comparaison des activités enzymatiques de ces cellules avec celles des cellules traitées par le RU 38.486, inhibiteur compétitif des glucocorticoïdes, nous amène à penser que ces faibles variations observées sont négligeables. Nous pouvons en déduire que si la dexaméthasone induit spécifiquement une augmentation de l'activité de l' α 2,6ST(N) des cellules FR3T3, en contre partie, elle ne semble pas affecter cette activité lorsque celle-ci est déjà induite par l'expression de l'oncogène ras.

3 - La dexaméthasone ne modifie pas la synthèse de l'ARNm de l' α 2,6ST(N) dans les cellules FRras.

De manière à corréliser ces observations enzymatiques avec le taux d'expression de l'enzyme, nous avons effectué la révélation d'un northern-blot par hybridation de 35 μ g d'ARN totaux isolés des cellules FRras traitées par la dexaméthasone et par des concentrations croissantes de RU 38.486, avec l'ADNc codant pour l' α 2,6ST(N) marqué au 32 P. La figure 28 (p.143) montre que, quelque soient les conditions dans lesquelles ont été cultivées les cellules FRras, l'intensité du signal correspondant au transcrit de 4,7 kb reste constante. En outre, la comparaison de l'effet de la dexaméthasone sur l'expression du messager de l'enzyme dans les deux lignées cellulaires, FR3T3 et FRras (Fig.29,

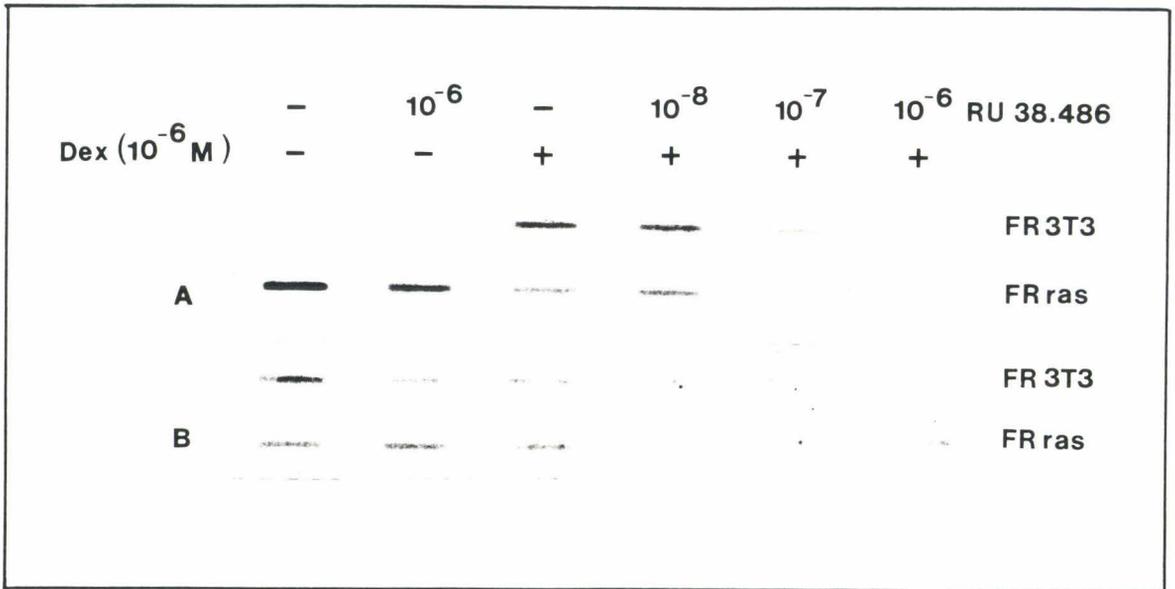


Figure 29 : Comparaison du taux d'expression de l'ARNm de l' α 2,6ST(N) exprimé dans les cellules FR3T3 et FRras.

Le slot-blot effectué par dépôts de 30 μ g d'ARN totaux extraits des cellules FR3T3 et FRras cultivées ou non en présence de 1 μ M ou de concentrations croissantes de RU 38.486 selon la méthode décrite dans l'appendice technique, a été révélé par hybridation avec l'ADNc de l' α 2,6ST(N) (A) ou de la β -actine de Rat (B).

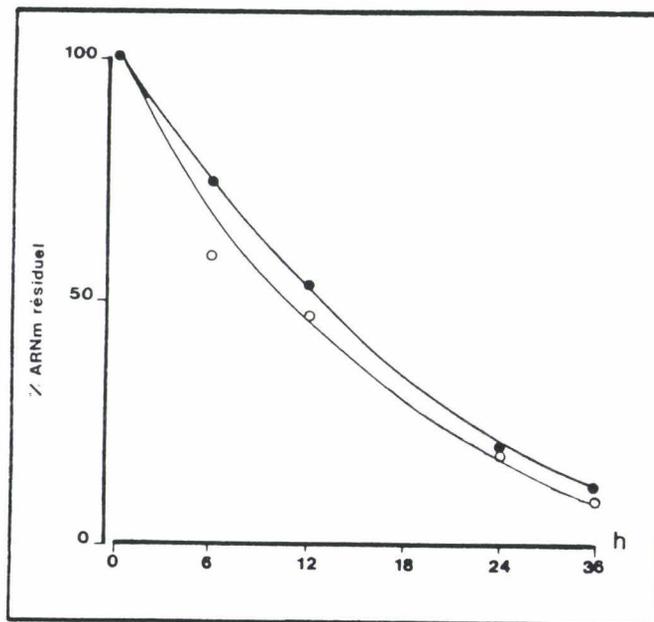


Figure 30 : Effet de la dexaméthasone sur la stabilité de l'ARNm codant pour l' α 2,6ST(N) dans les cellules FRras.

La stabilité de l'ARNm codant pour l' α 2,6ST(N) des cellules FRras traitées par 1 μ M de dexaméthasone est comparée aux cellules témoins FRras. La méthode utilisée est décrite dans l'appendice technique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ARNm résiduel (100% représentant le taux d'ARNm en absence d'actinomycine D) (○), FRras; (●), FRras traitées par la dexaméthasone (FRrasDex).

p.145), révèle effectivement l'obtention d'un profil très différent de l'expression du messager entre les cellules normales et transformées, semblant confirmer que l'expression de l'ARNm de 4,7 kb, déjà fortement induite par l'oncogène c-Ha-ras, ne réponde plus à l'effet de la dexaméthasone.

Néanmoins, si les glucocorticoïdes activent la transcription de certains gènes, ils sont également capables soit d'inhiber la transcription d'autres gènes, soit d'altérer la demie-vie de certains ARNm spécifiques (revue de Venkatesh & Ballard, 1991). Ainsi, afin de vérifier si la coopération entre l'expression de l'oncogène ras et l'induction de la voie des récepteurs des glucocorticoïdes par la dexaméthasone dans les cellules FR3T3, n'affectait pas la stabilité de l'ARNm de 4,7 kb, nous avons cultivé les cellules FRras jusqu'à 30 h en présence de 10 µg/ml d'actinomycine D de manière à inhiber la synthèse d'ARN. La figure 30 (p.145) montre l'ARNm résiduel codant pour l' α 2,6ST(N) dans les cellules FRras témoins et dans les cellules traitées par le glucocorticoïde. La cinétique de dégradation des transcrits est sensiblement identique entre les deux types cellulaires ce qui indique que, comme pour les cellules FR3T3, la dexaméthasone n'affecte pas la stabilité de l'ARNm codant pour l' α 2,6ST(N). Ceci nous permet de conclure que la dexaméthasone ne modifie pas la transcription du gène de l' α 2,6ST(N) dans les cellules FRras.

4 - Sialylation des glycoprotéines des cellules FRras.

La figure 31 (p.147) qui montre la révélation des glycoprotéines cellulaires par incubation avec la SNA marquée à l'iode¹²⁵, après séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et en milieu réducteur et électro-transfert sur membrane de nitro-

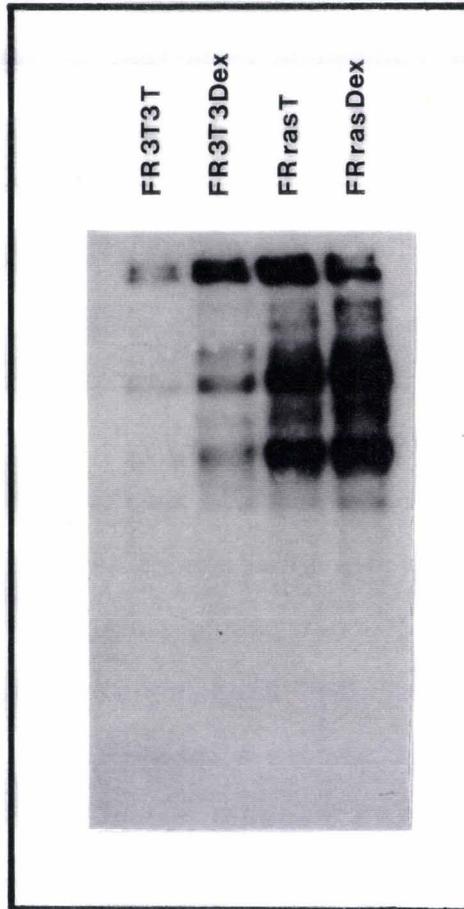


Figure 31 : Western-blot des glycoprotéines des cellules FR3T3 et FRras traitées par la dexaméthasone et le RU 38.486, révélé par hybridation avec la lectine SNA marquée à l'iode¹²⁵.

cellulose, nous a permis de faire plusieurs observations. Ainsi, nous confirmons que l'expression de l'oncogène ras induit une augmentation de la sialylation en liaison $\alpha 2,6$ des glycoprotéines des cellules FR3T3, similaire, voire légèrement supérieure à l'induction observée par traitement de ces cellules par la dexaméthasone. D'autre part, le traitement des cellules FRras par ce même glucocorticoïde ne modifie pas le taux de sialylation de ces glycoprotéines en liaison $\alpha 2,6$. Cette observation permet donc de corréliser les résultats démontrés précédemment avec la glycosylation terminale des N-glycosylprotéines exprimées dans ces cellules.

Sur la base de ces différents résultats, nous pouvons donc conclure que le gène de l' $\alpha 2,6$ ST(N), dont la transcription est spécifiquement induite par la voie des récepteurs des glucocorticoïdes dans les cellules FR3T3, semble échapper au contrôle des glucocorticoïdes lorsque ces cellules sont préalablement transformées par transfection de l'oncogène humain c-Ha-ras.

5 - Dosage des récepteurs des glucocorticoïdes des cellules FR3T3 et FRras.

Afin de vérifier si ces cellules transformées étaient sensibles ou non aux glucocorticoïdes, nous avons déterminé et comparé les paramètres cinétiques de la fixation spécifique de la dexaméthasone, ainsi que le nombre de récepteurs des glucocorticoïdes exprimés dans les cellules FR3T3 et FRras.

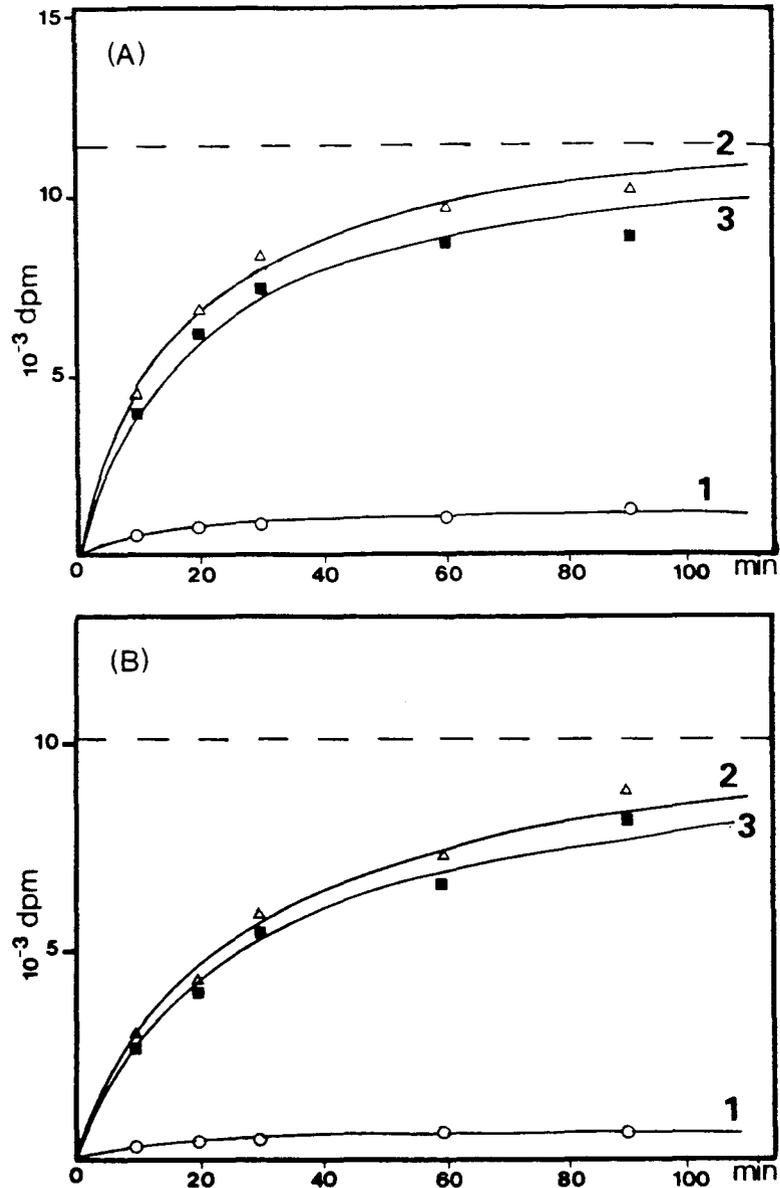


Figure 32 : Cinétiques de fixation de la dexaméthasone par les cellules FR3T3 et FRras.

La concentration finale de la dexaméthasone tritiée dans le milieu de culture est de 2,8 nM. (A) et (B) représentent respectivement les résultats obtenus pour les cellules FR3T3 et FRras. La fixation spécifique du glucocorticoïde (courbes 3) par les cellules est déduite par soustraction de la fixation non spécifique (courbes 1) à la quantité de dexaméthasone radioactive incorporée dans les cellules (courbes 2). Les valeurs d'incorporation maximales obtenues sont de 11.400 dpm pour les cellules FR3T3 et de 10.100 dpm pour les cellules FRras.

48 h après le repiquage, après lavage et préincubation pendant 1 heure dans un milieu sans sérum, les cellules FR3T3 et FRras ont été incubées en présence de 2,8 nM de dexaméthasone tritiée pendant 10 à 90 minutes. Les cinétiques de fixation de la dexaméthasone (courbes 3), obtenues après déduction de la fixation non spécifique (courbes 1) à la quantité de radioactivité incorporée dans les cellules (courbes 2) sont présentées dans la figure 32 (p.149). Ces résultats nous révèlent que les cellules FRras, tout comme les cellules FR3T3, présentent une fixation spécifique et saturable de la dexaméthasone, témoignant de leur sensibilité au traitement par les glucocorticoïdes. Bien que l'incorporation apparaisse à la fois plus faible et plus lente pour les cellules transformées, la détermination des valeurs de l'incorporation maximale pour la concentration finale de 2,8 nM en [³H]-dexaméthasone (11.400 dpm pour FR3T3 et 10.100 dpm pour FRras) laisse à penser que la fixation spécifique des glucocorticoïdes est sensiblement comparable pour les deux lignées cellulaires.

Néanmoins la densité cellulaire étant de l'ordre de $1,5 \pm 0,15$ fois plus élevée dans les cultures de cellules transformées que dans les cultures de cellules témoins, nous avons par la suite exprimé les résultats en tenant compte du nombre de cellules.

La comparaison de la fixation spécifique entre les deux lignées cellulaires, en fonction de la concentration en dexaméthasone libre, présente dans le milieu de culture, nous a permis de définir à la fois le nombre de récepteurs exprimés par les cellules ainsi que les constantes d'affinité. Les résultats obtenus, résumés dans le tableau XII (p.151), nous montrent que les cellules FR3T3 et FRras présentent respectivement une constante d'affinité de 5,47 nM et de 9,6 nM et une fixation maximale de 98,67 et de 52,53 pmol de dexaméthasone.h⁻¹ pour 10⁶

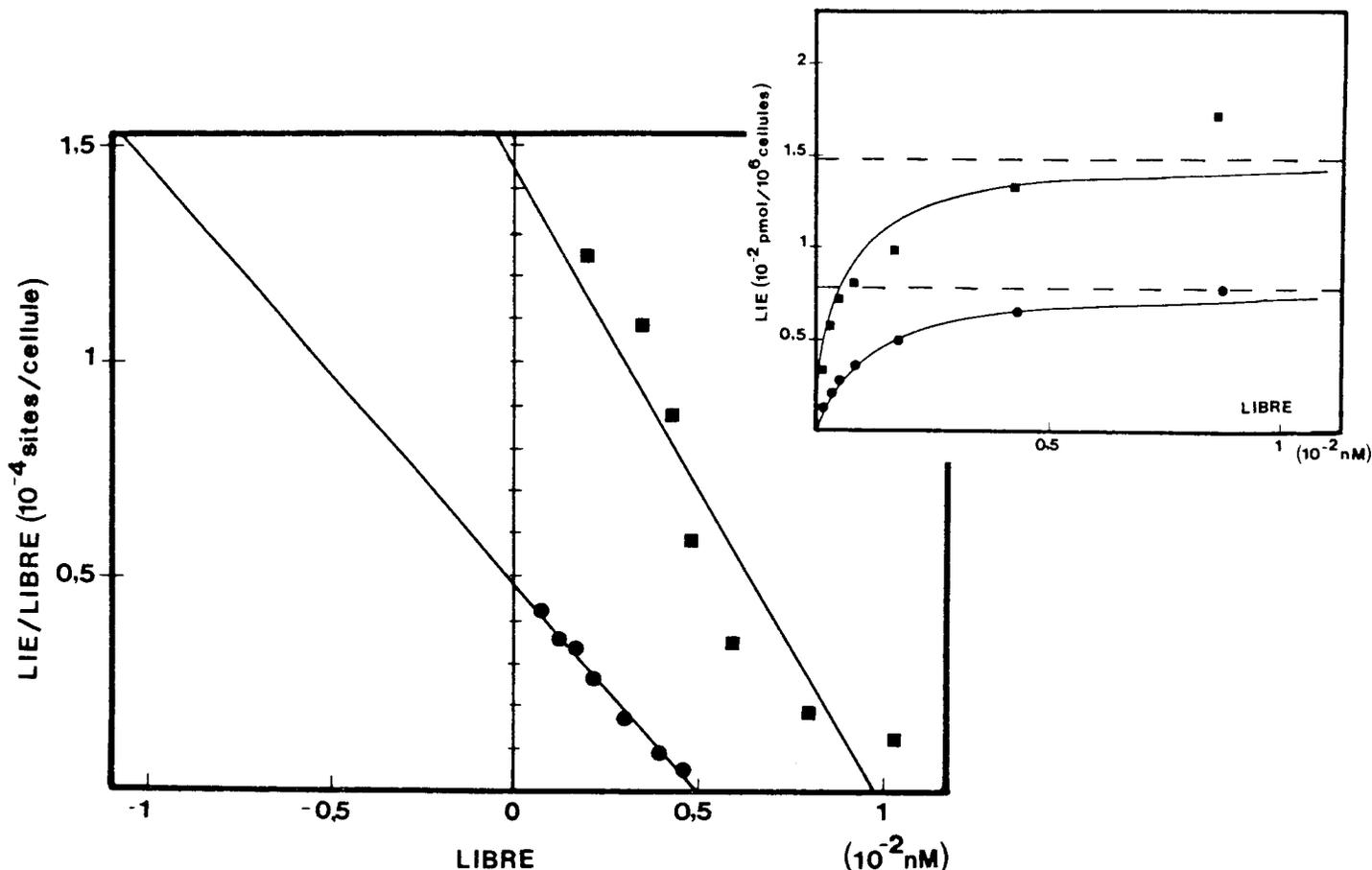


Figure 33 : Fixation spécifique de la dexaméthasone par les cellules FR3T3 et FRras.

La fixation de la dexaméthasone par les cellules FRT3T3 (—■—■—■) et FRras (—●—●—●) a été effectuée selon le protocole décrit dans l'appendice technique. Les résultats sont représentés selon la méthode de Scatchard et les paramètres cinétiques sont résumés et comparés dans le tableau XIII.

Tableau XII : Paramètres cinétiques de la fixation spécifique de la dexaméthasone par les cellules FR3T3 et FRras obtenus d'après la figure 33. Les valeurs de fixation maximales sont données pour 10⁶ cellules.

	Cellules		Rapport
	FR3T3	FRras	FR3T3/FRras
Fixation maximale (pmol.h ⁻¹)	98,67	52,53	1,87
Constante d'affinité (pmol)	5,47	9,60	1,75
Nombre de récepteurs par cellule	98 100	49 400	1,98

cellules. Ces valeurs exprimées sous forme d'un rapport entre les cellules normales et les cellules transformées (1,8 et 1,9) (Tab.XII, p.151) sont en totale corrélation avec le rapport existant entre le nombre de récepteurs (98 100 sites par cellule FR3T3 et 49 400 sites par cellule FRras) exprimés dans chaque cellule (Fig.33, p.151).

Discussion et conclusion de la première partie.

Bien qu'exprimant de l'ordre de 2 fois moins de récepteurs des glucocorticoïdes que les cellules FR3T3, les cellules FRras sont toutefois sensibles aux glucocorticoïdes et montrent une cinétique de fixation spécifique de la dexaméthasone comparable aux cellules FR3T3. Dans ces conditions, il semble que le fait que la dexaméthasone ne soit pas capable d'augmenter la transcription de l' α 2,6ST(N) dans les cellules FRras, soit directement une conséquence de l'expression de l'oncogène c-Ha-ras dans les cellules FR3T3. De fait, deux hypothèses différentes peuvent être avancées.

* Tout d'abord, nous pouvons supposer que la transcription de l' α 2,6ST(N) étant déjà très fortement induite dans les cellules FRras, l'expression de cet enzyme ne puisse plus être sur-activée sous l'effet de la dexaméthasone.

* D'autre part, l'existence d'un site "composite GRE" peut toujours être envisagée. Selon ce modèle décrit par Diamond et al. (1991) (Fig.34, p.153) le fait que l'expression de l'oncogène ras dans nos cellules inhibe l'activation transcriptionnelle de l' α 2,6ST(N) par les glucocorticoïdes, pourrait être lié à l'induction par cet oncogène de l'expression de la protéine Fos, induction déjà décrite pour certaines

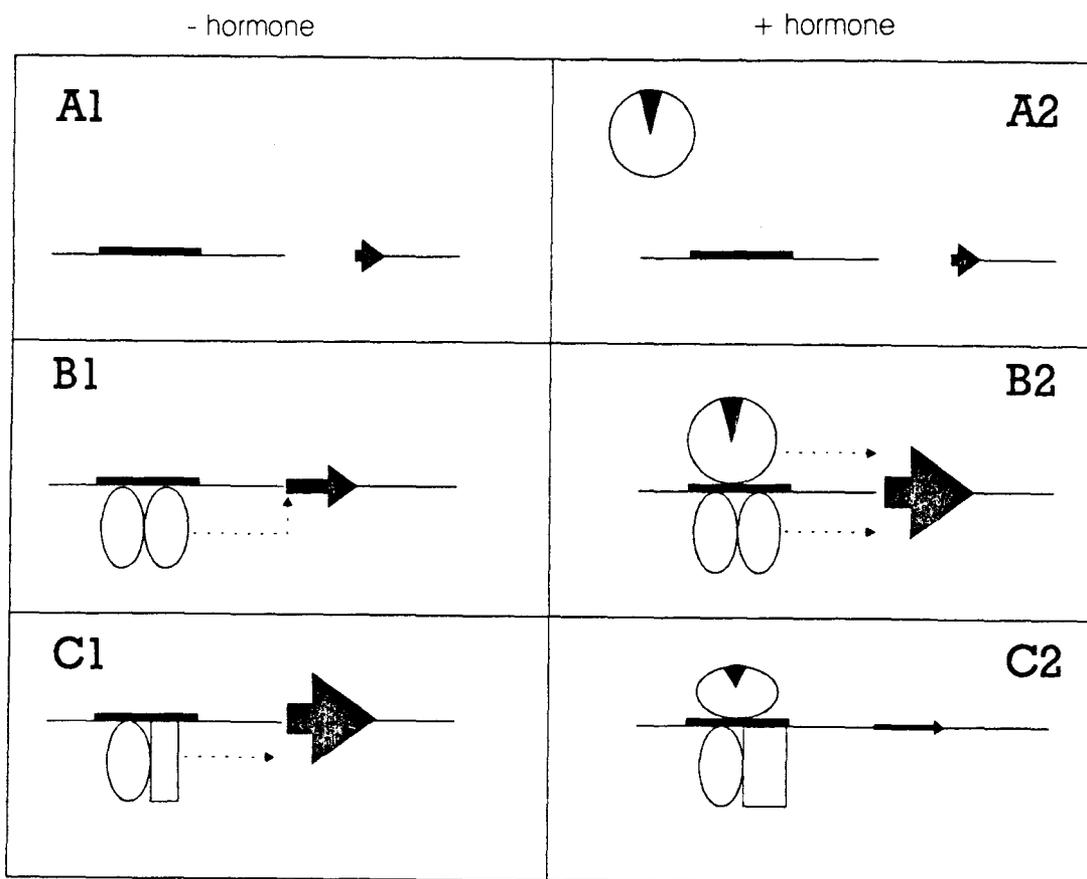


Figure 34 : Modèle de l'activité des sites "composites GRE" (d'après Diamond et al., 1991)

Dans chaque figure, le trait gras représente un site "composite GRE" composé d'un site GREn (site GRE dégénéré par mutation) et d'un site TRE (TPA response element). Les ovals représentent les protéines Jun, les rectangles, les protéines Fos, les ronds barrés, les complexes récepteur-dexaméthasone. Les flèches en pointillés entre les facteurs et le promoteur indiquent une augmentation de l'activité. la flèche () indique qu'il n'y a pas d'activité transcriptionnelle, la flèche () indique une faible activation transcriptionnelle, () indique une forte activation transcriptionnelle et () indique une inhibition de l'activité transcriptionnelle.

Figures A1 et A2 : en absence de complexe AP-1, le complexe récepteur-hormone ne peut pas interagir avec le site "composite GRE".

Figures B1 et B2 : le complexe homodimérique Jun-Jun seul se lie au site TRE et active l'activité du site "composite TRE"; le complexe récepteur-hormone interagit avec le site "composite TRE" et le dimère Jun-Jun et active fortement la transcription du gène cible.

Figures C1 et C2 : l'hétérodimère Jun-Fos augmente fortement l'activité du promoteur; le complexe récepteur-hormone interagit avec le "composite GRE" et l'hétérodimère Jun-Fos formant ainsi un complexe ayant une conformation non fonctionnelle pour une augmentation de la transcription.

lignées cellulaires (Stacey et al., 1987). Sachant qu'un site "composite GRE" ne peut être actif que lorsque son site TRE (TPA response element) est occupé par un complexe AP-1 (hétérodimère Jun-Fos ou homodimère Jun-Jun), le taux de transcription de base de l' $\alpha 2,6$ ST(N) dans les cellules FR3T3 s'effectuerait selon le schéma B1. Alors que la fixation d'un complexe Jun-Jun n'influe que très faiblement l'activité du "composite GRE" en absence de dexaméthasone, cette fixation induirait selon la figure 34B2 (p.153) une très forte induction transcriptionnelle de l' $\alpha 2,6$ ST(N) en présence de dexaméthasone. Dans le cas des cellules FRras, l'induction de la production de la protéine Fos permettrait, selon la figure 34C1 (p.153) de remplacer le complexe Jun-Jun par un complexe Jun-Fos qui, ayant une affinité très nettement supérieure pour les sites TRE, se fixerait préférentiellement sur le "composite GRE". D'après le modèle C, en absence de dexaméthasone, cette fixation induirait une forte augmentation de la transcription de l' $\alpha 2,6$ ST(N) alors qu'après traitement par la dexaméthasone, la fixation du complexe Jun-Fos inhiberait l'effet inducteur du récepteur des glucocorticoïdes conformément à ce que nous avons pu déduire de nos résultats. Cependant, une telle hypothèse doit être vérifiée. Pour cela, trois types d'expériences pourraient être réalisées : la comparaison de l'expression des protéines Fos dans les deux lignées cellulaires, l'étude de l'effet de la dexaméthasone sur des cellules FRras dans lesquelles l'expression du gène c-fos pourrait être bloquée par des séquences nucléotidiques anti-sens et l'étude de l'effet de la sur-expression des protéines Fos dans les cellules FR3T3 consécutivement à la transfection d'un gène c-fos inductible.

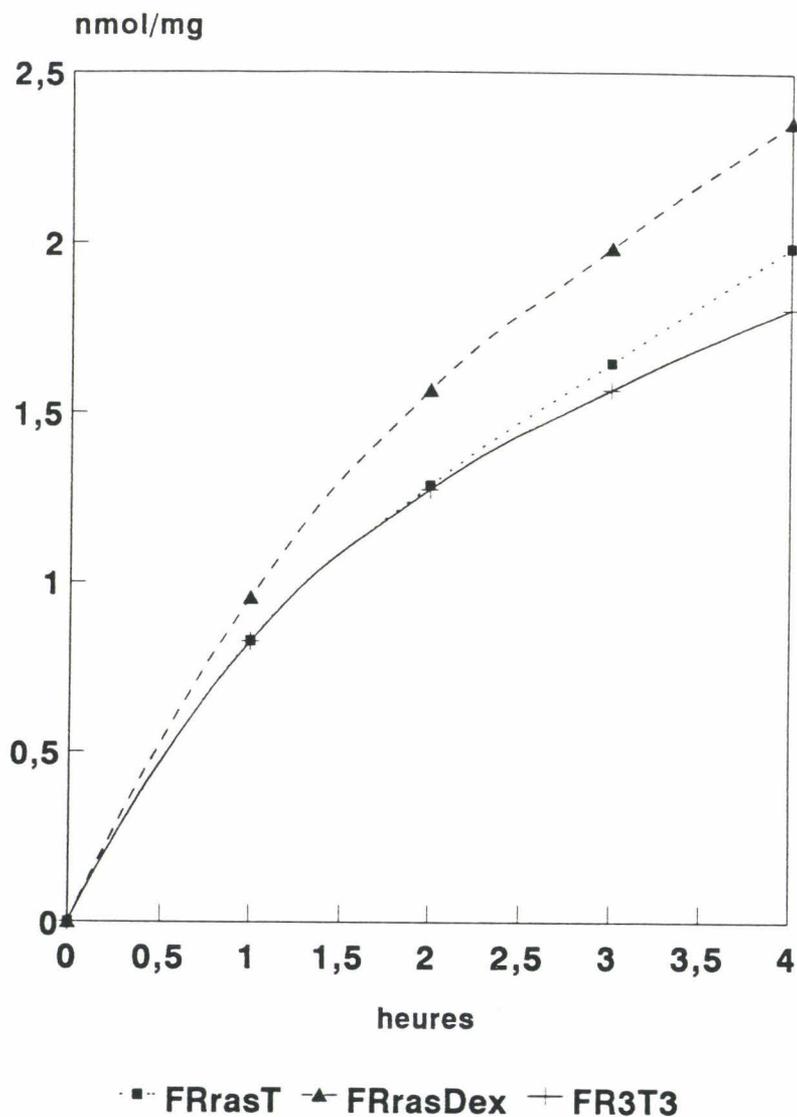


Figure 35 : Effet de la dexaméthasone sur la cinétique de transfert d'acide sialique des cellules FRras vis-à-vis de l'asialo-fétuine (ASFet).

Les homogénats des cellules cultivées ou non en présence de $1 \mu\text{M}$ de dexaméthasone ont été incubées avec l'ASFet (à une concentration finale de $1,6 \text{ mM}$ en résidus de Gal terminaux) dans les conditions standard décrites dans l'appendice technique. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne de trois expérimentations.

B - 2^{ème} partie : Analyse de la sialylation de l'asialo-fétuine.

1 - Cinétiques de transfert de l'acide sialique sur les glycanes de l'asialo-fétuine.

Une autre série d'expériences a été menée en utilisant l'asialo-fétuine comme substrat. Après culture des cellules 48 h en présence de 1 μ M de dexaméthasone, nous avons comparé les capacités de transfert de résidus d'acide sialique des homogénats de cellules FRras avec les homogénats des cellules non traitées et des cellules FR3T3.

La figure 35 (p.155) montre que le traitement des cellules FRras par la dexaméthasone induit une faible augmentation (d'un facteur $1,32 \pm 0,17$) des capacités sialyltransférasiques vis-à-vis de cet accepteur comparée à l'induction observée préalablement pour les cellules FR3T3. Cette observation conforte les observations obtenues précédemment tendant à montrer que la dexaméthasone n'a pas d'effet sur les activités des différentes sialyltransférases des cellules transformées.

En outre, les capacités de transfert des cellules FRras et FR3T3 sont totalement identiques vis-à-vis de cet accepteur contrairement à ce que nous avons pu observer en utilisant l'asialo-orosomucoïde. En se basant sur ces résultats et compte tenu que l'asialo-fétuine possède à la fois trois N-glycannes de type N-acétyllactosaminique tri-antennés et trois O-glycannes de type I (Nilsson et al., 1979), ceci tendrait à montrer que, outre une augmentation de la sialylation des structures N-glycosidiques, l'expression de l'oncogène ras induit également une diminution de la sialylation des structures liées O-glycosidiquement. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les produits de sialylation de l'asialo-fétuine.

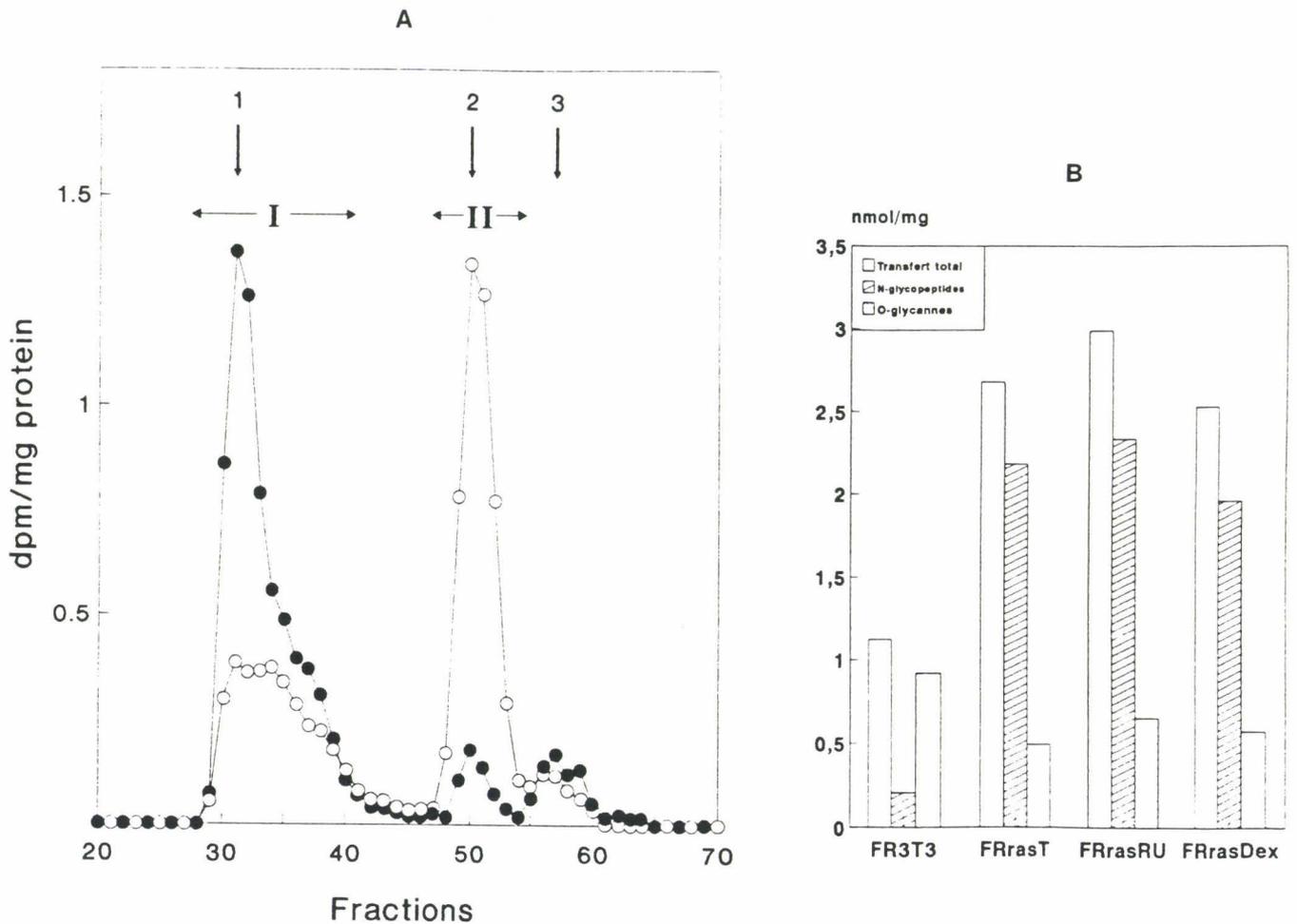


Figure 36 : Fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire des produits de β -élimination des [^{14}C]-glycannes de l'asialo-féтуine sialylés par les homogénats des cellules FR3T3 et FRras.

Les oligosaccharides réduits ont été séparés sur une colonne de Biol-Gel P4 (100 x 1,6 cm) équilibrée dans l'acétate de pyridine pH 5,6 et élués par le même tampon avec un débit de 12 ml/h.

A : La colonne a été préalablement calibrée par : (1), les N-glycannes de la féтуine; (2), les O-glycannes mono- et disialylés de la féтуine; (3), Neu5Ac. (○—○) et (●—●) correspondent respectivement à l'ASFet sialylée par les homogénats cellulaires des cellules FR3T3 et FRras. Cette figure a été extraite de l'article n°3 cité en introduction.

B : Représentation schématique du transfert total et des profils d'élution obtenus après incubation de l'ASFet avec les homogénats des cellules FRras témoins (FRrasT), des cellules traitées par 2 μM de RU 38.486 (FRrasRU) et par 1 μM de dexaméthasone (FRrasDex).

2 - Analyse de la sialylation des glycanes de l'asialo-fétuine.

Après incubation de l'asialo-fétuine en présence des homogénats de cellules FR3T3 et FRras dans les conditions standard, nous avons effectué une β -élimination en milieu réducteur des glycanes liés O-glycosidiquement. La séparation de ces derniers des N-glycosylpeptides par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P4 (Fig.36A, p.157), permet d'obtenir deux pics majeurs élués respectivement au volume d'éluion des N-glycanes (1) et des O-glycanes (2) de la fétuine. Il apparaît que, parallèlement à l'augmentation du transfert du [14 C]-Neu5Ac sur les structures de type N-glycosidique (pic I), qui reflète l'élévation de l'activité de l' α 2,6ST(N) que nous avons décrite précédemment, le transfert des résidus d'acide sialique sur la fraction O-glycosidique est fortement diminuée lorsque les homogénats des cellules FRras sont utilisés comme source d'enzyme.

En contre partie, l'analyse de la sialylation des glycanes de l'asialo-fétuine par les cellules FRrasDex démontre (Fig.36B, p.157) que le traitement par 1 μ M de dexaméthasone des cellules FR3T3 préalablement transformées par l'oncogène ras ne modifie pas les capacités de transfert de ces cellules sur chacun des deux types de glycanes. Compte tenu des résultats que nous avons démontré dans les chapitres précédents, cette observation est tout à fait en corrélation avec le fait que l'expression de l' α 2,6ST(N) ne soit pas modifiée par traitement des cellules FRras par la dexaméthasone.

Conclusion de la deuxième partie.

Nous avons préalablement observé que la culture des cellules FR3T3 en présence de dexaméthasone augmentait d'un facteur $\pm 1,56$ la capacité de sialylation des structures O-glycosidiques. Nous démontrons ici que l'expression de l'oncogène ras induit une diminution d'un facteur voisin de 8 de cette sialylation. D'après ces résultats, suggérant une forte inhibition de l'activité de l' $\alpha 2,3$ ST(O) par l'expression de l'oncogène ras, contrairement à l'hypothèse que nous avons proposé d'un effet compétitif entre la voie des récepteurs des glucocorticoïdes et l'effet de l'expression de l'oncogène ras par l'intermédiaire d'un site "composite GRE" sur la régulation de l' $\alpha 2,6$ ST(N), il semblerait ici que l'action de ces deux systèmes sur la régulation de l'expression de l' $\alpha 2,3$ ST(O) soit totalement différente et indépendante. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de comparer les taux de transcription de cet enzyme dans les cellules FR3T3 et FRras, cultivées ou non en présence de dexaméthasone.

**ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA Ga1 β 1-3Ga1NAc α -2,3-SIALYLTRANSFERASE
DANS LES CELLULES FR3T3.**

I - INTRODUCTION.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, parallèlement à l'augmentation de l'activité de l' α 2,6ST(N), reflet d'une activation transcriptionnelle de cet enzyme, la transformation des cellules FR3T3 par l'oncogène ras induit également une forte diminution de la sialylation des O-glycannes de l'asialo-fétuine. L'analyse en HPLC du pic II obtenu après β -élimination (Fig.36A, p.157), ainsi que l'utilisation d'accepteurs spécifiques tels que Gal β 1-3GalNAc α -O-ser ou Gal β 1-3GalNAc α -O-pNP ont permis d'associer cette diminution de transfert d'acide sialique à la diminution de l'activité de la CMP-NeuAc: Gal β 1-3GalNAc α -2,3-sialyltransférase (α 2,3ST(O)), les autres sialyltransférases agissant sur le noyau de type 1, α 2,6ST(O)I et α 2,6ST(O)II, n'étant soit pas exprimées soit insensibles à la présence de l'oncogènes ras.

L'analyse des paramètres cinétiques ainsi que des expériences d'inhibition, ont par ailleurs, suggéré que cette diminution de l'activité de l' α 2,3ST(O) résultait d'une diminution du nombre de molécules enzymatiques actives dans les cellules FRras.

De manière à corréler cette observation avec le taux de transcription de l'enzyme, nous nous sommes proposée d'étudier les taux d'expression de l'ARNm codant pour l' α 2,3ST(O) dans les cellules FR3T3 et FRras. En outre, nous avons préalablement observé que la traitement par la dexaméthasone induisait une légère augmentation de la sialylation des structures O-glycosidiques par les cellules FR3T3. De manière à vérifier que cette induction dépendait également du taux d'expression de l' α 2,3ST(O), nous avons donc tenté de comparer l'expression des messagers de l' α 2,3ST(O) dans les cellules FR3T3 et FRras traitées ou non par la dexaméthasone.

Lorsque nous nous sommes proposée d'effectuer ces recherches, la séquence de cet enzyme n'était pas encore publiée. Ainsi, afin de disposer d'un ADNc spécifique de cet enzyme, nous avons effectué un séjour dans le laboratoire du Professeur Roland Schauer (Kiel, Allemagne) et travaillé en collaboration avec Serge Kelm, qui a participé au clonage de l' α 2,3ST(O).

II - RESULTATS ET DISCUSSION.

La sonde que nous avons utilisée pour caractériser l'ARNm codant pour l' α 2,3ST(O) dans les cellules FR3T3, provient de l'un des clones d'ADNc obtenus lors du clonage de l'enzyme à partir d'une banque de glande sous-maxillaire de Porc. Lorsque nous avons débuté nos expériences, il avait été démontré que cette sonde était capable de s'hybrider aux ARN messagers de Rat. En effet, la comparaison du taux d'expression de l'ARNm codant pour l' α 2,3ST(O) dans les différents tissus de Rat avait été effectuée grâce à l'utilisation d'un tel ADNc et avait permis de révéler une bande d'une taille voisine de 5,7 kb dans les glandes sous-maxillaires, le foie, le poumon, la rate et la muqueuse intestinale, tissus connus pour synthétiser de grandes quantités de structures O-glycosidiques, suggérant que cet enzyme subissait une régulation de son expression en fonction des tissus, soit par un contrôle du taux de transcription soit par une régulation de la stabilité de l'ARNm (Gillepsie et al., 1991, 1992).

A partir de ces observations, nous avons donc effectué la révélation d'un northern-blot par hybridation de cette sonde marquée à la digoxigénine avec 40 μ g d'ARN totaux isolés des cellules FR3T3 et

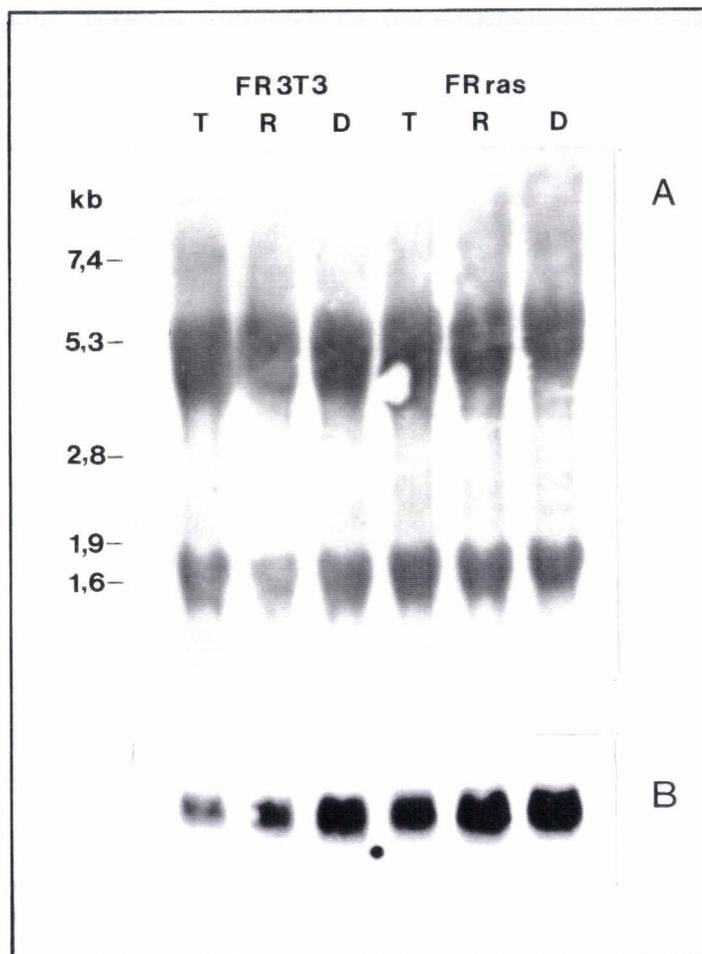


Figure 37 : Hybridation de l'ADNc de l' $\alpha 2,3ST(O)$ avec les ARN des cellules FR3T3 et FRras cultivées ou non en présence de 1 μM de dexaméthasone ou de 2 μM de RU 38.486.

40 μg d'ARN total des cellules FR3T3 et FRras ont été hybridés avec l'ADNc de l' $\alpha 2,3ST(O)$ de Porc (A) ou l'ADNc de l'actine- β de Souris (B) marqués à la digoxigénine.

T : cellules témoins, R : RU 38.486 2 μM , D : dexaméthasone 1 μM .

FRras cultivées ou non en présence de 1 μM de dexaméthasone ou de 2 μM de RU 38.486. La figure 37A (p.163) montre deux signaux de forte intensité et de même amplitude quel que soit la lignée cellulaire et les conditions de culture. La présence de deux signaux pouvait s'expliquer par le fait que le premier signal très étalé, situé dans une zone allant approximativement de 6 à 4,5 kb, pouvait correspondre au signal de 5,7 kb décrit précédemment, alors que le deuxième signal pouvait résulter d'une révélation plus intense du signal inférieur visible dans la révélation du northern-blot effectuée par Gillespie et al. (1992) et de ce fait correspondre à un deuxième transcrite de taille inférieure codant pour cet enzyme. Cette hypothèse nous semblait d'autant plus acceptable qu'il existe, par exemple, trois familles d'ARN messagers de tailles différentes codant pour l' $\alpha_2,6\text{ST(N)}$ chez le Rat.

Cependant, le fait que ces deux signaux étaient à la fois très étalés et surtout très intenses par comparaison au signal obtenu après révélation de la β -actine (Fig.37B, p.163), protéine fortement exprimée dans cette lignée fibroblastique, nous a conduit à mettre en doute la spécificité de cette révélation par la sonde obtenue à partir de l'ADNc de l' $\alpha_2,3\text{ST(O)}$ de glande sous-maxillaire de Porc. En effet, cette enzyme étant vraisemblablement plus faiblement exprimée que l'actine dans les cellules FR3T3, il était tout à fait probable que la révélation spécifique des messagers codant pour l' $\alpha_2,3\text{ST(O)}$ puisse être masquée par une hybridation non spécifique de la sonde.

De manière à vérifier la spécificité de cet ADNc pour les ARNm de l'enzyme et en se basant sur la spécificité d'expression des ARNm de l' $\alpha_2,3\text{ST(O)}$ dans les tissus de Rat, nous avons effectué un dot-blot des ARNs de rate et de rein de Rat. Selon les résultats obtenus par Gillespie et al. (1991) l'ARNm de 5,7 kb est très fortement exprimé

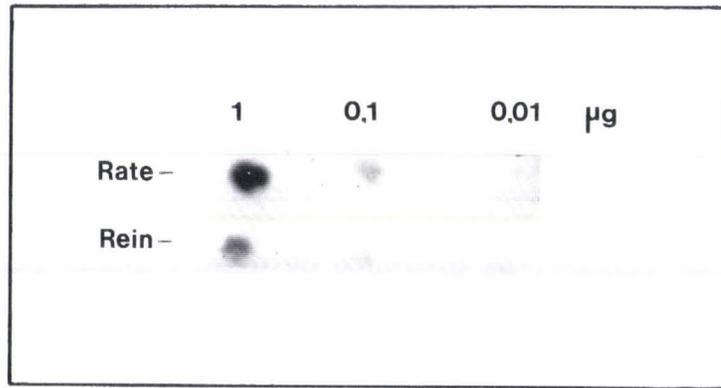


Figure 38 : Dot-blot révélé par hybridation des ARNm poly A⁺ de rate et de rein de Rat avec l'ADNc de l' α 2,3ST(O).

1 μ g, 100 ng et 10 ng d'ARNm poly A⁺ purifiés de rate et de rein de Rat ont été déposés sur membrane de nylon et hybridés avec la sonde ADNc de l' α 2,3ST(O).

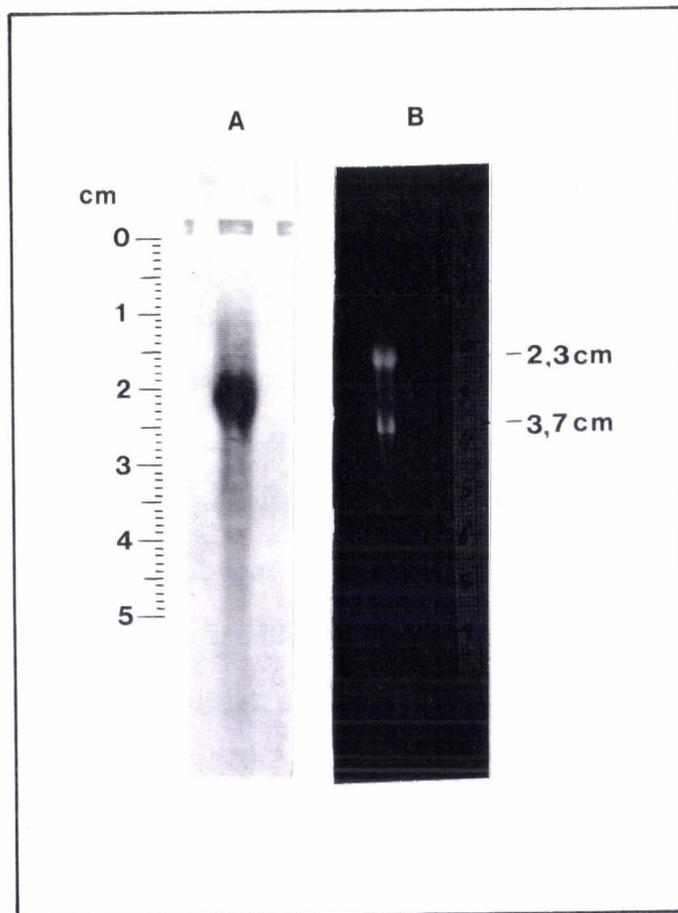


Figure 39 : Hybridation de 30 μ g d'ARN total de cellules FR3T3Dex avec l'ADNc de l' α 2,3ST(O).

(A) : Les conditions de préhybridation et d'hybridation décrites dans le protocole de détection des sondes marquées à la digoxigénine (température = 68°C, 2% d'agent bloquant) ont été modifiées. Le northern-blot a été préhybridé et hybridé à 55°C dans un tampon à 4% d'agent bloquant et contenant 0,5 mg/ml d'ARNt de Levure. Les lavages ont été effectués à 60°C au lieu de 68°C.

(B) : Photographie du gel effectuée avant le transfert des ARN sur membrane de nylon. La position des ARN ribosomiaux de 28s (4,72 kb) et de 18s (1,87 kb) dans le gel est repérée par une règle graduée située à droite des bandes. Ces ARNr sont respectivement à 2,3 cm et 3,7 cm du puit de dépôt.

dans la rate alors qu'il ne l'est pas dans le rein. La figure 38 (p.165) correspondant à la révélation du dot-blot par hybridation de notre sonde avec des quantités décroissantes d'ARNm extraits de rate et de rein de Rat et purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo dT, révèle que pour une quantité de 1 μg d'ARNm, le signal obtenu pour la rate est considérablement plus intense que celui obtenu pour le rein et diminue proportionnellement avec la quantité d'ARN, montrant que l'ADNc utilisé reconnaît effectivement le ou les messagers codant pour l' $\alpha_2,3\text{ST(O)}$. Toutefois l'obtention d'un faible signal pour l'ARN poly A⁺ de rein stipule que dans ce signal réside toutefois une partie de fixation non spécifique de la sonde.

Enfin, le profil de révélation que nous avons obtenu dans la figure 37A (p.163) nous avait fait également songer à une hybridation non spécifique de notre sonde avec les ARN ribosomiaux de 28s et de 18s. Afin de tenter de diminuer cette fixation non spécifique de la sonde, nous avons ultérieurement effectué les préhybridations et les hybridations, d'une part, avec une concentration en réactif bloquant de l'ordre du double de celui décrit dans le protocole de détection des sondes marquées à la digoxigénine et en ajoutant de fortes concentrations d'ARNt de Levure, ceci afin de bloquer au maximum les sites de fixation non spécifique, et d'autre part, à des températures moins élevées que celles préconisées dans le protocole afin d'augmenter la spécificité d'hybridation. Après hybridation de la sonde avec 30 μg d'ARN total extrait des cellules FR3T3Dex dans ces conditions, et lavages dans des conditions plus stringentes, le northern-blot a été révélé (Fig.39A, p.165). La comparaison de cette autoradiographie avec la photo 39B (p.165) du gel effectuée avant le transfert sur membrane de nylon révèle que le signal de forte intensité situé à 2,3 cm du point

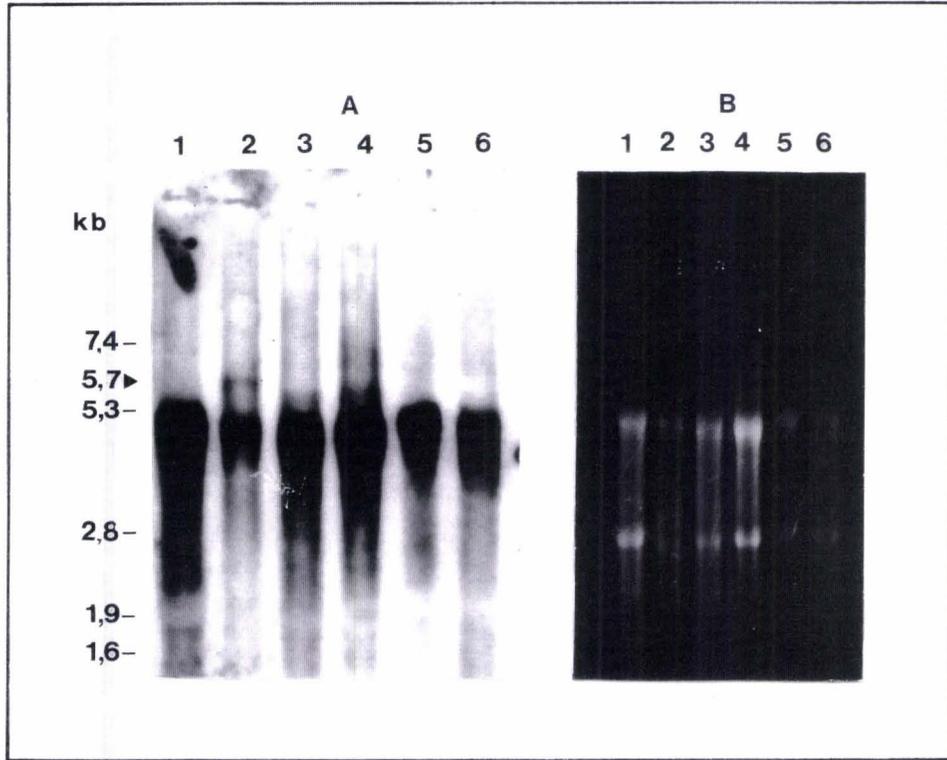


Figure 40 : Comparaison de l'hybridation de différents ARNm plus ou moins purifiés par passages sur colonnes d'oligo dT avec l'ADNc de l' $\alpha 2,3ST(O)$. L'exposition de l'autoradiographie a été volontairement poussée après des révélations préliminaires afin de révéler au maximum la bande de taille légèrement inférieure à 6 kb dans l'ARNm n° 2 (►). Les ARN utilisés correspondent sur l'autoradiographie (A) et sur la photographie du gel effectuée avant leur transfert (B) à : (1) : 5 μg d'ARNm de foie de Rat poly A^- ; (2) : 4,5 μg d'ARNm de foie de Rat poly A^+ ; (3) : 4 μg d'ARNm de foie de Rat poly (A^+) $^-$; (4) : 5 μg d'ARNm de cerveau de Rat poly A^- ; (5) : 5 μg d'ARNm de rate de Rat poly A^+ ; (6) : 5 μg d'ARNm de rein de Rat poly A^+ . Les ARNm de (1) à (4) nous ont été fournis par le Dr S. Kelm (Kiel, Allemagne).

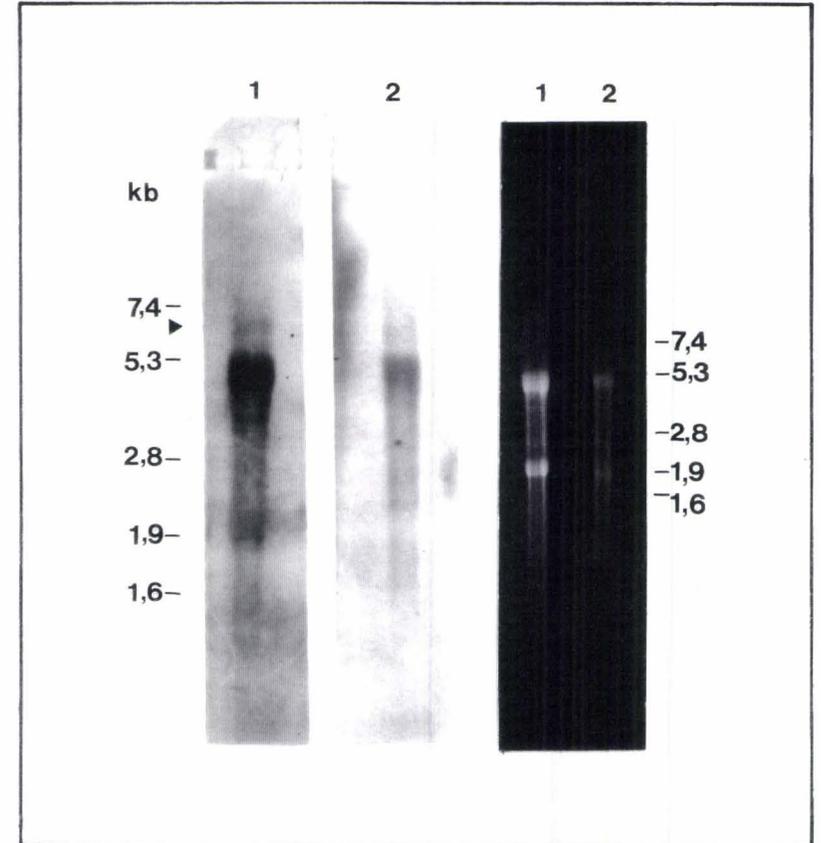


Figure 41 : Hybridation de l'ARNm poly A^+ des cellules FR3T3Dex avec l'ADNc de l' $\alpha 2,3ST(O)$. (2) : 10 μg d'ARNm poly A^+ purifié des cellules FR3T3Dex ont été hybridés avec la sonde. (1) : 30 μg d'ARN total de rate de Rat servent de témoin.

de dépôt ainsi que le signal de plus faible intensité situé à 3,7 cm, correspondent effectivement tous deux à la révélation des ARN ribosomiaux de 28s et de 18s respectivement.

Au vu de ces résultats nous avons donc ultérieurement comparé l'hybridation de notre sonde avec différents ARNm poly A⁺ plus ou moins purifiés sur colonnes d'oligo dT. La figure 40A (p.167) correspondant à la révélation du northern-blot montre que seul l'ARNm poly A⁺ du foie de Rat présente une plus faible hybridation non spécifique en dessous de 5,3 kb, mais surtout montre, après une longue exposition en autoradiographie, un signal situé légèrement en dessous de 6 kb, signal qui pourrait effectivement correspondre à la révélation d'un messenger de 5,7 kb.

Dans ces conditions, nous avons alors effectué un northern-blot avec 30 μg d'ARN de rate de Rat et 10 μg d'ARN poly A⁺ des cellules FR3T3Dex. La révélation que nous avons obtenue (Fig.41, p.167), nous permet effectivement de visualiser très faiblement un signal pour la rate, comme pour les cellules FR3T3Dex, situé entre 7,4 et 5,3 kb, mais apparemment trop lourd pour correspondre à la révélation de l'ARNm de l' $\alpha 2,3\text{ST(O)}$.

III - CONCLUSION.

Ainsi, à la lumière de ces différents résultats, il nous est apparu que ce clone d'ADNc de l' $\alpha 2,3\text{ST(N)}$ porcine s'hybridait de manière non spécifique avec différents ARNs dont les ARN ribosomiaux, mais ne nous

Figure 42 : (A) Séquence complète de l' α 2,3ST(O). La séquence supposée correspondre au signal d'ancrage est encadrée. Les sites potentiels de glycosylation contenant la séquence Asn-X-Thr sont indiqués par une *astérisque* (d'après Gillespie *et al.*, 1992). La séquence complémentaire de la sonde oligonucléotidique synthétisée est soulignée.

(B) Séquence oligonucléotidique utilisée comme sonde pour révéler les ARNm des cellules FR3T3.

(A)

```

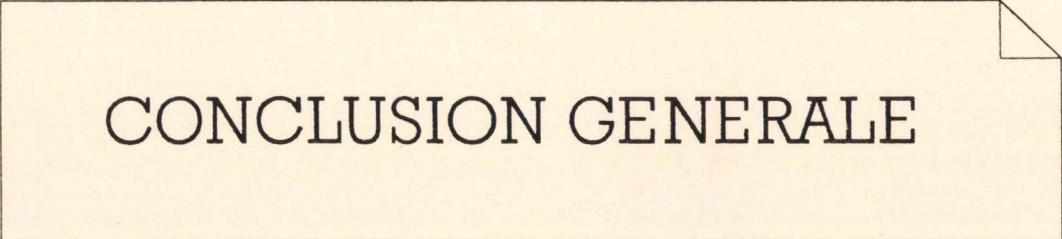
-90 CTT CTT GGG AGG TGC TCG TCC GTT AGG CGT GGG TTC CTG CAT CCC ATC CCT GGG GTG CCC CTG CCC CGC GCC CCG GCC GGG GAG GC A GAC - 1
  1 ATG GCC CCC ATG AGG AAG AAG AGC ACC CTC AAG CTG CTC ACG CTC CTG GTC CTC TTC ATC TTC CTC ACC TCC TTC TTC CTC AAC TAC TCG 90
  1 MET Ala Pro Met Arg Lys Lys Ser Thr Leu Lys Leu Leu Thr Leu Leu Val Leu Phe Ile Phe Leu Thr Ser Phe Phe Leu Asn Tyr Ser 30
  91 CAC ACC GTG GTC ACC ACC GCC TGG TTC CCC AAG CAG ATG GTC ATC GAG CTC TCC GAG AAC TTC AAG AAG CTC ATG AAA TAC CCC TAC AGG 180
  31 His Thr Val Val Thr Thr Ala Trp Phe Pro Lys Gln Met val Ile Glu Leu Ser Glu Asn Phe Lys Lys Leu Met Lys Tyr Pro Tyr Arg 60
  131 CCC TGC ACC TGC ACC CGC TGC ATC CAA GAG CAG AGG GTC TCC CCC TGG TTC GAT GAG CGA TTC AAC CGG TCC ATG CAG CCG CTG CTG ACG 270
  61 Pro Cys Thr Cys Thr Arg Cys Ile Glu Glu Gln Arg Val Ser Ala Trp Phe Asp Glu Arg Phe Asn Arg Ser Met Gln Pro Leu Leu Thr 90
  271 GCC AAG AAC GCG CAC CTG GAG GAA GAC ACT TAC AAG TGG TGG CTG AGG CTC CAG CCG GAG AAG CAG CCC AAT AAC TTG AAC GAC ACC ATC 360
  91 Ala Lys Asn Ala His Leu Glu Glu Asp Thr Tyr Lys Trp Trp Leu Arg Leu Gln Arg Glu Lys Gln Pro Asn Asn Leu Asn Asp Thr Ile 120
  361 AGG GAG CTG TTC CAG GTG GTG CCT GGG AAC GTG GAC CCC CTG CTG GAG AAG AGG CTG GTC AGC TGC CGG CGC TGC GCC GTC GTG GGC AAC 450
  121 Arg Glu Leu Phe Gln Val Val Pro Gly Asn Val Asp Pro Leu Leu Glu Lys Arg Leu Val Ser Cys Arg Arg Cys Ala Val Val Gly Asn 150
  451 TCG CGC AAC CTG AAG GAG TCC TAC TAT GGG CCT CAG ATA GAC ACC CAC CAC TTC GTG CTC AGG ATC AAC AAG GCC CCC ACG GAG GGG TTT 540
  151 Ser Gly Asn Leu Lys Glu Ser Tyr Tyr Gly Pro Gln Ile Asp Ser His Asp Phe Val Leu Arg Met Asn Lys Ala Pro Thr Glu Gly Phe 180
  541 GAG GCC CAC GTC GGG AGC AAG ACC ACC CAC CAT TTC GTG TAC CCC GAG AGC TTC CGG GAG CTG GCG CAG GAG GTC AGC ATG ATC CTG GTC 630
  181 Glu Ala Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr His His Phe Val Tyr Pro Glu Ser Phe Arg Glu Leu Ala Gln Glu Val Ser Met Ile Leu Val 210
  631 CCC TTC AAG ACC ACC GAC CTG GAG TGG GTG ATC AGC GCC ACC ACC ACC GGC ACC ATC TCC CAC ACC TAC GTT CCT GTC CCC GCC AAG ATC 720
  211 Pro Phe Lys Thr Thr Asp Leu Glu Trp Val Ile Ser Ala Thr Thr Thr Gly Thr Ile Ser His Thr Tyr Val Pro Val Pro Ala Lys Ile 240
  721 AAA GTC AAA AAG GAG AAG ATC CTG ATT TAT CAC CCG GCC TTC ATC AAG TAC GTC TTC GAC AGG TGG CTG CAG GGC CAC GGG CGC TAC CCG 810
  241 Lys Val Lys Lys Glu Lys Ile Leu Ile Tyr His Pro Ala Phe Ile Lys Tyr Val Phe Asp Arg Trp Leu Gln Gly His Gly Arg Tyr Pro 270
  811 TCC ACT GGC ATC CTC TCC GTG ATC TTC TCC CTG CAC ATC TGT GAC GAG GTC GAC TTG TAT GGC TTT GGG GCG GAC AGC AAA GGG AAC TGG 900
  271 Ser Thr Gly Ile Leu Ser Val Ile Phe Ser Leu His Ile Cys Asp Glu Val Asp Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Asp Ser Lys Gly Asn Trp 300
  901 CAC CAC TAC TGG GAG AAC AAC CCT TCG GCG GGG GCT TTC CCA AAG ACC GGG GTG CAC GAC GGG GAC TTC GAG TCC AAC GTG ACA ACC ATC 990
  301 His His Tyr Trp Glu Asn Asn Pro Ser Ala Gly Ala Phe Arg Lys Thr Gly Val His Asp Gly Asp Phe Glu Ser Asn Val Thr Thr Ile 330
  991 TTG GCT TCC ATC AAC AAG ATC CGG ATC TTC AAG GGC AGA TGA CGC CGC GCA GGT TAA GGA CAG TTG CAG CAG CTC ACC TCT CGA CGT CCA 1080
  331 Leu Ala Ser Ile Asn Lys Ile Arg Ile Phe Lys Gly Arg ***
1081 GCC CCG GCA ACT TCG TGG CCC AGC CTC AGG GGT GTC CCC AGG TGC CCC
    
```

(B) 5'> ATA AAT CAG GAT CTT CTC CTT TTT GAC TTT GAT CTT >3'

permettait pas de révéler le messager de 5,7 kb de l'enzyme dans les cellules FR3T3.

A la fin de notre séjour dans le laboratoire de Professeur R. Schauer, la séquence nucléotidique de l'ADNc de l'enzyme ayant été publiée (Fig.42A, p.169), nous avons effectué les mêmes expériences en utilisant cette fois une sonde oligonucléotidique (Fig.42B, p.169) synthétisée à partir de la séquence publiée par Gillespie et al. (1992). Les différentes révélations de northern-blot que nous avons effectuées par hybridation de cette sonde oligonucléotidique marquée ou au ³²phosphore ou à la digoxigénine avec les ARNm extraits de nos cellules FR3T3 et FRras cultivées ou non en présence de dexaméthasone ou de RU 38.486, se sont toutes révélées négatives. Le fait que nous n'obtenions aucun signal dans ces conditions nous amène à penser que, contrairement à l' α 2,6ST(N), le taux d'expression des ARNm codant pour l' α 2,3ST(O) dans nos fibroblastes de Rat est excessivement faible et qu'il nous faudrait utiliser des quantités d'ARN nettement plus importantes.

De cette manière, il nous a donc été malheureusement impossible de corréliser cette forte diminution de l'activité de l' α 2,3ST(O) que nous avons observée consécutivement à l'expression de l'oncogène ras dans les cellules FR3T3 avec le taux d'expression de l'ARNm.



CONCLUSION GENERALE

GENERAL CONCLUSION : ENGLISH VERSION

At the end of this memory, we can underline the several following points:

I - Since it was demonstrated that the transfection of oncogenes or the over-expression of cellular proto-oncogenes into rodent cells induces the same modifications in the glycosylation pattern at the cell surface than these previously observed in spontaneous tumor cells, we compared the effect of the expression of the human c-Ha-ras oncogene into mice fibroblasts NIH3T3 on the activities of the α -1,3-galactosyl- and sialyl-transferases, both involved in the terminal glycosylation of glycoproteins.

These studies allowed us to observe that, though the α -1,3-galactosyltransferase activity remains unchanged, the total capacity of transfer of sialic acid residues is enhanced after transformation of cells by the ras oncogene. This elevation, that we correlated with the tumorigenicity and metastatic behaviour of the NIHras cells, was mainly due to an elevation of the α 2,6ST(N) expression. Thus, the decrease in the terminal Gal α -1,3- residues to the benefit of sialic acid residues previously shown by Santer et al. (1989) on the N-glycopeptides purified from NIHras cells, reflects a competitive effect between both enzymes.

Therefore, concomitantly with the enhanced activity of the N-acetylglucosaminyltransferase V observed by Dennis et al. (1989) in rat2 fibroblasts transformed by the same oncogene, we showed that the transforming expression of this gene into a mice fibroblast cell line, induced a weak decrease in the activity of the α 2,3ST(N/O), but, more

significantly, induced an elevation of the expression of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$. Considered together, these results indicate, on the one hand, that the human c-Ha-ras oncogene has a specific action on the glycosylation pattern of the N-glycoproteins and on the other hand, has a quite different effect according to the used cellular model.

The works from Easton et al. (1991) confirm the involvement of the genes of the ras family in the synthesis of N-linked glycans. Comparing the activities of sialyltransferases involved in the N-glycosylation pattern between normal and transformed NIH3T3 cells, showing that the over-expression of the ras gene modified differently the activity of some of these enzymes, the combination of these changes suggests, an increased sialic acid density, an increase in the number and/or length of polylactosaminoglycans chains and an increased branching of the N-glycans. Nevertheless, the ras genes do not contain any genetic information for protein glycosylation and must modify cellular glycosylation by interfering with the host cell enzymes regulation systems, and more probably, by direct or indirect interference via the p21 protein in the genic regulation of these glycosyltransferases. In particular, the mechanism(s) by which the ras gene activates the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ is already unknown. However, since the glucocorticoids as dexamethasone were shown to induce the expression of this enzyme in rat serum and in rat liver (Kaplan et al., 1983; Wang et al., 1989), we could speculate that the similar enhancement of the activity of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ we observed, could probably reflect a glucocorticoid-like effect of the ras oncogene.

In order to verify such hypothesis, we studied the effect of the dexamethasone on the sialyltransferase activities in fibroblasts. For these studies, we used an other cellular model, the Fisher rat

fibroblasts, cell line showing a higher induction of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ activity after transfection of the ras oncogene (Le Marer et al., 1992).

II - The study of the sialyltransferase activities of the FR3T3 cells treated or not by the dexamethasone revealed us that the increase of the capacity of transfer of sialic acid residues observed in the cells cultured with the glucocorticoid was the result of a wide elevation of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ activity. This induction, depending of the glucocorticoid-receptor pathway, that we correlated with an increase of the sialylation in $\alpha 2,6$ -linkage of cellular glycoproteins, resulted of an elevation of the quantity of 4,7 kb mRNA directly consequent to an enhancement of the transcriptional rate of the gene encoding the enzyme and not to an enhancement of the stability of the message.

Our results are fully in agreement with a regulation of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ gene by the glucocorticoid-receptor pathway proposed by Wang et al. (1990). To date, number of genes responsive to the glucocorticoids have been identified and it was shown that glucocorticoids regulate the rate of transcription and content of mRNA. The current model of glucocorticoid action postulates the existence of inactive glucocorticoid receptors (GR) associated with hsp90 proteins in the cytoplasm. Steroid molecules enter the cell and bind to the GR, causing dissociation of hsp90. The activated hormone-receptor complex migrates into the nucleus, where the GR binds to specific DNA sites, termed glucocorticoid response elements (GRE), in the promoter region of glucocorticoid-responsive genes. After binding of GR to the GRE, gene transcription is either enhanced or repressed. The exact mechanism by

which this occurs is not known but likely involves interactions between the GR and other transcriptional factors and/or RNA polymerase II.

Thus, according to our results and to those obtained by Wang et al. (1990), showing that two isoforms of mRNA sized 4.3 and 4.7 kb produced by an alternative use of two different promoters, are induced by the glucocorticoids, it would appear that the $\alpha 2,6ST(N)$ contains at least two distinct GRE sites. However, no consensus sequence corresponding to a such site has been identified in the promoter region of the 4,3 kb sized mRNA since the study of this region 1 kb upstream the initiation start was carried out. It is possible that the GRE sites are located more upstream and/or downstream of the promoter region of the two transcripts.

An other argument could also explain that no GRE site has been characterized in this promoter since Diamond et al. (1990) showed the existence of an other class of DNA sequences binding the glucocorticoid receptors in the promoter region of some genes. These sequences termed "composite GRE" do not have the consensus sequence GGTACAnnnTGTTCT of the classical GRE sites.

Finally, one of the arguments which led us to propose that a such site could be involved in the transcriptional regulation of the $\alpha 2,6ST(N)$ by the glucocorticoids, was that these composite GRE need for their activity, not only the binding of the receptors but also the binding of transcriptional factors. In particular, one of the composite GRE possesses binding sites for the activating protein 1 transcriptional factor (AP-1), dimeric complex composed with the products of the c-jun and c-fos oncogenes, genes activated by the ras oncogene.

Some results obtained in our laboratory (Le Marer et al., 1992) demonstrated a quite similar induction of the $\alpha 2,6ST(N)$ by the ras oncogene in the FR3T3 cells, induction related to a enhancement of the

4.7 kb sized mRNA level. These data, compared with our results, allowed us to suggest that a synergic effect between the action of ras and the glucocorticoid-receptors pathway could exist, involving an eventual composite GRE site. In order to resolve that point, we studied then the effect of the dexamethasone on the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ activity in the FR3T3 cells transformed by transfection of the ras oncogene, which would induce a additional elevation of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ activity already induced by the expression of the oncogene.

III - Comparing the capacity of FRras, treated or not with dexamethasone , to transfer sialic acid residues onto N-acetyllactosamine N-linked glycans, we observed that this glucocorticoid did not modify the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ activity of these transformed cells (Fig.27, p.143). In order to correlate this enzymatic observation with the expressional level of the enzyme, a northern-blot experiment was carried out by hybridizing the ^{32}P -labelled $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ cDNA probe with 35 μg of total cellular RNA purified from cells treated with dexamethasone and RU 38.486. Figure 28 (p.143) shows that, whatever were the culture conditions, the signal corresponding to the 4.7 kb sized message was of the same intensity. Furthermore, the comparison of the effect of the dexamethasone on the expression of the message coding for the enzyme between both cell lines, FR3T3 and FRras (Fig.29, p.145), revealed actually a quite different pattern in the expression of the transcript between normal and transformed cells, suggesting that the expression of the 4.7 kb mRNA, already greatly induced by the ras oncogene, was not sensitive anymore to the glucocorticoid.

Nevertheless, if the glucocorticoids activate the transcription of some target genes, they can also inhibit the transcription of other genes or alter the stability and, consequently, steady-state levels of specific mRNAs. In order to verify that the cooperation between the expression of the ras oncogene and the induction of the glyocorticoid-receptors pathway did not affect the stability of the 4.7 kb mRNA, the cells were exposed up to 30 h to 10 μ g/ml actinomycin D to inhibit further mRNA synthesis. Figure 30 (p.145) shows that the kinetics of degradation of the remaining α 2,6ST(N) mRNA in control and dexamethasone treated FRras cells were quite similar, indicating as for the FR3T3 cells, that the dexamethasone did not modify the stability of the transcripts. This allowed us to conclude that the dexamethasone does not change the transcriptional level of the α 2,6ST(N) gene in FRras cells.

Figure 31 (p.147), which shows the hybridization of the cellular glycoproteins with the 125 I-labelled SNA lectin, allowed us to underline several points. On the one hand, we confirmed that the expression of the c-Ha-ras oncogene induces an elevation of the sialylation in α 2,6-linkage of the glycoproteins purified from FR3T3 cells similarly or weakly higher than the induction observed after treatment of these cells with the dexamethasone. On the other hand, that the treatment of the FRras cells with the same glucocorticoid did not modify the sialylation rate of these glycoproteins in α 2,6-linkage.

On the basis of these different results, we could conclude that the α 2,6ST(N) gene, which the transcription is specifically induced by the glucocorticoid-receptors pathway in the FR3T3 cells, seems to escape the glucocorticoids control when the cells are first transformed by transfection of the human c-Ha-ras oncogene.

In order to verify if the transformed cells were sensitive or not to the glucocorticoids, we determined and compared the kinetic parameters of the specific binding of dexamethasone and quantified the glucocorticoid receptors expressed in the FR3T3 and FRras cells. 48 h after the last passage, wash and 1 h preincubation in serum-free DMEM, the cells were incubated with 2.8 nM ^3H -labelled dexamethasone for 10 to 90 minutes. Time courses of binding of dexamethasone (curves 3) obtained by deduction of non-specific binding (curves 1) to internalised radioactivity (curves 2) are shown in figure 32 (p.149). These results demonstrate that both cell lines had a specific and saturable binding of dexamethasone, attesting their sensitivity to glucocorticoid treatment. Though the incorporation seems at once weaker and slower for transformed cells, the determination of the V_m values (11 400 dpm for FR3T3 and 10 100 dpm for FRras cells) suggested that the specific binding of glucocorticoids is quite similar for both lines. Nevertheless, the cellular density being approximatively $1,5 \pm 0.15$ fold higher in transformed cell cultures, we expressed afterwards the results taking the quantity of cells into account.

The comparison of the specific binding between the two cell lines, in function of the free dexamethasone concentration, allowed us to quantify the number of expressed receptors and to define the affinity constants. The obtained results, given in table XII (p.151), showed that FR3T3 and FRras cells have respectively a $K_a = 5.47$ nM and $K_a = 9.6$ nM and a maximum binding of 98.67 and 52.53 pmol dexamethasone. h^{-1} for 10^6 cells. These values expressed as a ratio between normal and transformed cells (1.8 and 1.9) (Table XII, p.151) are completely correlated with the quantity of receptors (98 100 sites for FR3T3 and 49 400 sites for FRras) expressed in each cell line (Fig.33, p.151).

Thus, though the FRras cells expressed twice less receptors than the FR3T3 cells, they are sensitive to the glucocorticoids and show a kinetic of specific binding of dexamethasone similar to the FR3T3 cells. According to these data, it seems that the fact that dexamethasone did not enhance the transcription rate of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$, is a consequence of the expression of the c-Ha-ras oncogene into the FR3T3 cells. Two hypothesis could be purposed :

* First, we can suppose that the transcriptional rate of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ being already widely enhanced in the FRras cells, the expression level of this enzyme can not be over-activated by dexamethasone.

* On an other hand, the eventual involvment of a composite GRE site can always be possible. According to the model described by Diamond et al. (1991) (Fig.34, p.153), the fact that the expression of the ras gene inhibits the transcriptional activation of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ by dexamethasone, could be related to the induction by this oncogene of the expression of the Fos protein, induction already observed for some cell lines (Stacey et al., 1987). Since a composite GRE is active only if its TRE (TPA response element) site is occupied by a AP-1 complex (Jun-Jun homodimer or Jun-Fos heterodimer), the constitutive transcriptional rate of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ in the FR3T3 cells would carry out according to the scheme B1. Although the binding of a Jun-Jun complex activates weakly the activity of the composite GRE in absence of dexamethasone, this binding would induce, according the figure 34B2 (p.153), a very strong elevation of the transcription of the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$ in presence of dexamethasone. In the case of FRras cells, the induced production of Fos proteins would allow, according to the figure 34C1 (p.153), to replace the Jun-Jun complex by the Jun-Fos complex, complex which binds preferentially to the TRE site. According to the

model C, without dexamethasone, this binding would induce a wide enhancement of the transcriptional rate of the $\alpha 2,6ST(N)$ although after treatment by dexamethasone, this binding would inhibit the activating action of glucocorticoid receptors in accordance to what we could deduce from our results. However, in order to verify such hypothesis, three kinds of experiment should be carry out : quantification of expression of Fos proteins in both cell lines, study of the effect of dexamethasone treatment on FRras cells in whose the expression of c-fos gene would be inhibit by transfection of anti-sens cDNA and finally, the study of the over-expression of Fos protein in FR3T3 cells after transfection of a inducible c-fos gene.

IV - In an other serie of experiments, we analysed the sialylation of asialo-fetuin by FRras cells homogenates. After 48 h of culture of our cells with 1 μM dexamethasone, we compared the sialyltransferase activities of FRras cells with the untreated cells and FR3T3 cells. Figure 35 (p.155) shows that the treatment of the FRras cells by the dexamethasone induces a weak enhancement (1.32 ± 0.17 fold) of the sialyltransferase activity onto this acceptor compared to the induction previously observed with FR3T3 cells. This confirms the results obtained by using of complex-type acceptors, showing that the dexamethasone does not affect the different sialyltransferase activities in the transformed cells.

Besides, the capacities of transfer of sialic acid residues of FR3T3 and FRras cells are quite similar with asialo-fetuin on the opposition to the results obtained with asialo- $\alpha 1$ -acid glycoprotein. According to these results and to the fact that the asialo-fetuin contains three tri-

antennary complex-type glycans and three core 1 O-linked oligosaccharides (mainly Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-O)Ser), this would suggest that, in addition to an increase in the sialylation of the N-linked structures, the expression of the ras oncogene induces also a decrease in the sialylation of O-linked glycans. In order to confirm this hypothesis, we analysed the sialylation products of asialo-fetuin incubated with extracts of FR3T3 and FRras cells. Gel permeation on a Bio-Gel P4 column resolved the oligosaccharides obtained after β -elimination into two main peaks (Fig.36A, p.157) appearing respectively at the elution volume of N-linked (arrow at position 1) and of O-linked glycans of fetuin (arrow at position 2). It appeared that, concomitantly to the increased transfer of [14 C]Neu5Ac on N-linked chains (peak I), which reflects the elevated activity of the α 2,6ST(N) previously described, the transfer of sialic acid residues on O-linked fraction was greatly decreased when FRras cellular homogenates were used as enzyme source.

Furthermore, analysis of the sialylation of asialo-fetuin glycans by the FRrasDex cells (Fig.36B, p.157) shows that the treatment by 1 μ M dexamethasone of FR3T3 cells previously transformed by the ras oncogene, did not modify the capacity of transfer of these cells onto both types of glycans. In accordance to the results we presented in the chapter before, this observation is completely correlated with the fact that the expression of the α 2,6ST(N) was not modified by the treatment of FRras cells by dexamethasone.

We previously observed that the culture of FR3T3 cells with dexamethasone increased \pm 1.5 fold the capacity of sialylation of the O-linked glycans. Here we demonstrate that the expression of the ras gene induces a decrease (\sim 8 fold) of O-glycan sialylation. According to

these results suggesting a great inhibition of the activity of the $\alpha 2,3ST(O)$ by the expression of the ras oncogene and, in opposition to the hypothesis we proposed of a cooperative effect between the glucocorticoid receptor pathway and the effect of the expression of the ras oncogene through a "composite GRE" on the regulation of the $\alpha 2,6ST(N)$, it would seem that the action of both systems on the regulation of the expression of the $\alpha 2,3ST(O)$ is quite different and independent. In order to attest this hypothesis, we attempted to compare the transcriptional rate of this enzyme in the FR3T3 and FRras cells, cultured or not with dexamethasone.

V - As we showed in the last chapter, concurrently with the elevation of the activity of the $\alpha 2,6ST(N)$, in response to a transcriptional activation of this enzyme, the transformation of FR3T3 cells by the ras oncogene induces also a strong decrease in the sialylation of O-glycans of asialo-fetuin. HPLC analysis of peak II obtained after β -elimination (Fig.36A, p.157), and use of specific acceptors such as Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser or Gal β 1-3GalNAc α -O-pNP, allowed to associate this decrease of transfer of sialic acid residues with the decrease of the activity of the CMP-NeuAc: Gal β 1-3GalNAc α -2,3-sialyltransferase ($\alpha 2,3ST(O)$), the other sialyltransferases acting onto core type 1, $\alpha 2,6ST(O)I$ and $\alpha 2,6ST(O)II$, being either not expressed or non-sensitive to the presence of the ras oncogene.

The analysis of kinetic parameters and inhibition experiments, have furthermore suggested that this decreased activity is the reflect of the diminution of the number of active $\alpha 2,3ST(O)$ molecules in the FRras cells.

In order to correlate this observation with the transcriptional rate of the enzyme, we proposed to study the expression levels of the mRNA encoding the $\alpha 2,3ST(O)$ in the FR3T3 and FRras cells. Besides, we had previously observed that the treatment with dexamethasone induced a weak increase in the sialylation of O-linked glycans in FR3T3 cells. To verify that this induction was also dependent of the transcriptional level of the $\alpha 2,3ST(O)$, we attempted to compare the expression of $\alpha 2,3ST(O)$ transcripts in FR3T3 and FRras cells cultured or not with dexamethasone.

When we proposed to carry out these studies, the sequence of $\alpha 2,3ST(O)$ was not already published. Thus, for disposing a cDNA specific of this enzyme, we had a stay in the laboratory from the Professor Roland Schauer (Kiel, Germany) and worked in collaboration with Sorge Kelm, who participated to the cloning of the $\alpha 2,3ST(O)$.

The probe we used to characterize the mRNA coding for the $\alpha 2,3ST(O)$ in the FR3T3 cells arised from one of the cDNA clones obtained during the cloning of the enzyme from a porcine submaxillary gland library. When we carried out these experiments, it was demonstrated that this probe was able to hybridize the rat mRNA. Indeed, the comparison of the expression levels of $\alpha 2,3ST(O)$ mRNA in different rat tissues was performed owing to the use of a such cDNA, and allowed to characterize a ~ 5.7 kb band in salivary gland, liver, lung, spleen and colon mucosa, tissues known to synthesize large quantities of O-linked carbohydrate structures, suggesting that this enzyme is tissue-specific regulated through transcriptional control and/or stability of the message (Gillespie et al., 1991, 1992).

According to these observations, we carried out a northern-blot revelation by hybridizing this digoxigenin-labelled cDNA with 40 μ g of total RNA purified from FR3T3 and FR \underline{ras} cells cultured with or without 1 μ M dexamethasone or 2 μ M RU 38.486. Figure 37A (p.163) shows two strongly intensive signals with same amplitude whatever were the cell lines and the culture conditions. The presence of the two signals could be explained by the fact that the higher signal very expended, located approximatively between 6 and 4.5 kb, could correspond to the 5.7 kb signal previously described, and the smaller signal could result of a more intensive revelation of the inferior signal visible in the northern-blot revelation carried out by Gillespie et al. (1992) and so could be possibly a second message coding for this enzyme. This hypothesis can be possible all the more that were at least three different sized α 2,6ST(N) mRNAs previously characterized in the rat.

However, both signals appearing at once very expended and very intensive compared to the signal obtained by the revelation of the β -actin (Fig.37B, p.163), protein widely expressed in this fibroblast cell line, allowed us to challenge the specificity of this revelation. Indeed, the α 2,3ST(O) being probably less expressed in FR3T3 cells than is the β -actin, it was highly possible that the specific revelation of the messages encoding this enzyme could be hired by a non specific hybridization of the probe.

In order to attest the specificity of this cDNA towards the mRNAs of this enzyme and basing one's argument on the specificity of the expression of the α 2,3ST(O) mRNAs in rat tissues, we carried out a dot-blotting of RNA purified from rat spleen and kidney. According to the results obtained by Gillespie et al. (1991), the 5.7 kb message is widely expressed in spleen whereas it is not expressed in kidney.

Figure 38 (p.165), corresponding to the hybridization of the probe with decreased quantities of mRNAs extracted from rat spleen and rat kidney and purified on oligo dT columns, reveals that for 1 μ g of mRNA, the signal obtained for the spleen message is greatly more intensive than this one obtained for the kidney and decreases with the quantity of RNA showing that the used cDNA recognizes effectively the message(s) coding for the α 2,3ST(O). However, the low signal obtained with kidney material suggests that in this signal remains a part of non-specific binding of the probe.

Finally, the northern analysis we obtained in figure 37A (p.163) allowed us to think about a non-specific hybridization of probe with the 28s and 18s ribosomal RNAs. Attempting to decrease this unspecific binding of the probe, we carried out in following experiments the prehybridizations and the hybridizations, on the one hand, with higher concentrations of blocking reagent nearly 2 fold more than these described in the detection procedure of digoxigenin-labelled probes and also with addition in the buffers of high concentration of yeast tRNA to block the maximum of nonspecific sites on the membrane, and on the other hand, at lower temperatures than these given in the commercial procedure to increase the hybridization specificity. After hybridization of the probe with 30 μ g of total RNA isolated from FR3T3 cells in these conditions, and washes in more stringency conditions, the northern-blot were revealed (Fig.39A, p.165). The comparison of the autoradiogram with the figure 39B of the gel made before the transfer onto nylon membrane, shows that the strong signal located at 2.3 cm from the origin and that the lighter signal located at 3.7 cm, correspond respectively to the 28s and 18s rRNAs.

According to these results, we compared subsequently the hybridization of our probe with different polyA⁺ mRNA more or less purified onto oligo dT columns. Figure 40A (p.167) corresponding to the autoradiogram of the northern-blot shows that only the rat liver poly A⁺ mRNA gives the lower nonspecific hybridization under the size of 5.3 kb, but shows, after a long exposure time, a signal closed to 6 kb, signal which could effectively correspond to the 5.7 kb message.

In these conditions, we carried out a northern-blot with 30 μ g RNA from rat spleen and 10 μ g of poly A⁺ mRNA from FR3T3 cells. Figure 41 (p.167) allows us to visualize a weak signal with both RNAs located between 7.4 and 5.3 kb, but apparently too heavy to be the revelation of the message of the α 2,3ST(O).

In this way, according to these different results, it seemed that the porcine α 2,3ST(O) cDNA clone we used, hybridized on unspecific way with different RNAs including the rRNAs, but did not allow us to reveal the 5.7 kb message coding for the α 2,3ST(O) in the FR3T3 cells.

At the end of our stay in the laboratory from the Professor Roland Schauer, the nucleotide sequence of the α 2,3ST(O) cDNA was published (Fig.42A, p.169) (Gillespie et al., 1992). Consequently, we performed the same experiments than before, by using a 36 mer oligonucleotide probe (Fig.42B, p.169) synthesized from the total published sequence. The different revelations we carried out by hybridizing this oligonucleotide probe labelled with ³²P or digoxigenin with poly A⁺ mRNA purified from FR3T3 and FRras cells, cultured or not with dexamethasone or RU 38.486, were all negative. The fact that we obtained no

signal in these conditions allows us to think that, in the opposite to the $\alpha 2,6\text{ST(N)}$, the expression level of $\alpha 2,3\text{ST(O)}$ message in this rat fibroblast cell line is extremely low and therefore, that we should use higher quantities of RNAs.

In this way, it was unfortunately impossible for us to correlate the wide decrease of the $\alpha 2,3\text{ST(O)}$ activity that we observed consecutively to the ras oncogene expression in FR3T3 cells with the expressional rate of the mRNA encoding this enzyme.

CONCLUSION

Au terme de ce mémoire, il nous est possible de dégager les points suivants :

1) En comparant les activités α -1,3-galactosyl- et sialyltransférases des cellules NIH3T3 et des cellules NIHras, lignée cellulaire maligne provenant de la transfection de l'oncogène ras, nous avons pu caractériser une augmentation du transfert d'acide sialique dans les cellules transfectées par l'oncogène c-Ha-ras, alors que l'activité de l' α -1,3-galactosyltransférase était similaire dans les deux lignées cellulaires. Cette induction de l'activité sialyltransférase, que nous avons associée à la capacité tumorigène et métastatique de ces cellules, résulte essentiellement de l'augmentation de l'activité de l' α 2,6ST(N), enzyme impliqué dans la glycosylation terminale des N-glycoprotéines. En effet, alors que la sialylation des structures de type O-glycosidique n'est pratiquement pas modifiée dans les cellules NIHras, l'activité de cette enzyme est nettement augmentée dans les cellules transformées. Ces résultats semblent indiquer que la diminution du taux de galactosylation en liaison α -1,3, observée précédemment par Santer et al. (1989) dans les cellules NIHras, résulte d'un effet de compétition entre l' α -1,3-galactosyltransférase et l' α 2,6ST(N) vis-à-vis des structures acceptrices Gal(β 1-4)GlcNAc-R. Ces résultats ont, par ailleurs été confortés par l'augmentation de la fixation de la SNA, lectine spécifique des structures NeuAca2,6Gal/GalNAc, sur les glycoprotéines des cellules NIHras.

2) Une étude similaire, menée parallèlement sur une lignée de fibroblastes de Rat Fischer (cellules FR3T3) a permis de confirmer et de compléter ces observations. En particulier, cette étude a permis de

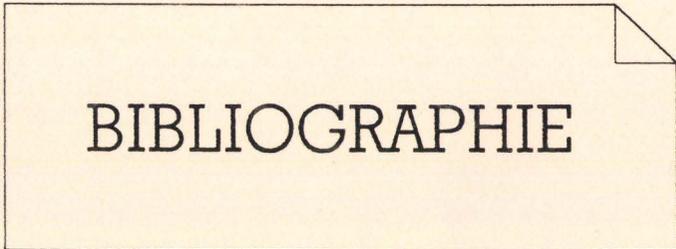
confirmer l'induction de l'activité de l' α 2,6ST(N) sous l'effet de l'expression de l'oncogène ras et de montrer que cette augmentation d'activité résultait de l'augmentation du taux d'expression d'un ARNm de 4,7 kb codant pour cet enzyme. En poursuivant l'étude de ce modèle cellulaire, nous avons pu montrer que l'expression de l'oncogène humain c-Ha-ras induisait une très forte diminution des capacités de sialylation des structures O-glycosidiques due à une diminution de l'expression de l' α 2,3ST(O) catalysant le transfert d'acide sialique sur les noyaux de type 1. Bien que nous ne soyons pas parvenue à associer cette observation avec le taux de transcription de l' α 2,3ST(O), il semblerait au vu de ces résultats que l'oncogène ras régule de manière différente plusieurs sialyltransférases au sein d'un même système cellulaire, et que cet oncogène ait également un effet différent sur les systèmes de glycosylation en fonction du modèle cellulaire considéré, ce qui va dans le sens d'une régulation génique des sialyltransférases spécifique des espèces.

3) Les études des activités sialyltransférasiques des cellules FR3T3 traitées par la dexaméthasone nous ont permis d'observer, tout d'abord que ces cellules étaient sensibles au traitement par les glucocorticoïdes. D'autre part, conformément aux résultats obtenus par Wang et al. (1990) montrant que la dexaméthasone induisait l'expression de l' α 2,6ST(N) des hépatocytes de Rat, nous révélons ici que ce même glucocorticoïde augmente fortement le taux de transcription d'une forme de 4,7 kb codant pour cet enzyme avec pour conséquence, une augmentation de l'activité de l' α 2,6ST(N) dans ces cellules et une augmentation de la sialylation en liaison α 2,6 des glycoprotéines cellulaires.

4) Lorsque ces mêmes cellules sont préalablement transformées par transfection de l'oncogène ras, l'expression de l' $\alpha 2,6ST(N)$ n'est plus induite par le traitement par la dexaméthasone. Alors que nous avons montré que les cellules FRras, tout comme les cellules normales FR3T3, exprimaient le récepteur des glucocorticoïdes et fixaient la dexaméthasone, le fait que l' $\alpha 2,6ST(N)$ échappe à la régulation transcriptionnelle des glucocorticoïdes dans les cellules FRras apparaît comme une conséquence directe de l'expression transformante de la protéine p21^{ras}.

Au vu de ces différents résultats, nous avons posé en hypothèse la participation d'un site "composite GRE" dans la régulation transcriptionnelle de l' $\alpha 2,6ST(N)$ chez le Rat. Le fait que ces sites dégénérés ne possèdent pas la séquence consensus classique d'un site GRE expliquerait le fait qu'aucun site GRE n'ait pu être caractérisé dans le promoteur de l' $\alpha 2,6ST(N)$ de foie de Rat. En outre, ce modèle permettrait à la fois d'expliquer l'augmentation de l'expression de l' $\alpha 2,6ST(N)$ que nous avons pu observer dans les cellules après traitement par la dexaméthasone ou après transfection de l'oncogène ras, et le fait que l'expression de cet oncogène inhibe l'activation transcriptionnelle par les glucocorticoïdes. Selon ce modèle, l'induction de protéines Fos par l'oncogène ras permettrait de remplacer le dimère Jun-Jun fixé sur le "composite GRE" et responsable du taux de transcription initial de l' $\alpha 2,6ST(N)$, par un complexe Fos-Jun nettement plus "affine" pour le site TRE. La fixation de ce complexe hétérodimérique, qui active fortement la transcription de l' $\alpha 2,6ST(N)$, inhiberait l'effet inducteur du récepteur des glucocorticoïdes en présence de la dexaméthasone. Toutefois, afin de vérifier cette hypothèse qui pourrait définitivement éclaircir le mécanisme de régulation de l' $\alpha 2,6ST(N)$ de Rat au cours de l'inflammation, il nous apparaît essentiel, à l'avenir, de quantifier le

taux d'expression de la protéine Fos dans les deux lignées cellulaires, FR3T3 et FRras, ainsi que d'analyser l'effet de la surexpression d'un gène c-fos inductible, transfecté dans les cellules FR3T3, sur l'activité et le taux de transcription de l' α 2,6ST(N).



BIBLIOGRAPHIE

- Adams J.M.**, Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M., Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D. & Brinster R.L. (1985) "The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice." *Nature*, 317; 434-438.
- Almoguera C.**, Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N. & Perucho M. (1988) "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes." *Cell*, 53; 549-554.
- Altevogt P.**, Fogel M., Cheingsong-Popov R., Dennis J., Robinson P. & Schirmmacher V. (1983) "Different patterns of lectin binding and cell surface sialylation detected on related high and low-metastatic tumor cell lines." *Cancer Res.*, 43; 5138-5144.
- Andres A.C.**, Schonenberger C.A., Groner B., Hennighausen L., Lemeur M. & Gerlinger P. (1987) "Ha-*ras* oncogene expression directed by a milk protein gene promoter : tissue specific, hormonal regulation and tumor induction in transgenic mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74; 1299-1303.
- Babinet C.** & Morello D. (1986) "Animaux transgéniques: une voie nouvelle pour l'étude du développement." *Médecine/Sciences*, 2; 253-259.
- Baker S.J.**, Markowitz S., Fearon E.R., Willson J.K.V. & Vogelstein B. (1990) "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science*, 249; 912-914.
- Barbacid M.** (1987) "*ras* genes." *Annu. Rev. Biochem.*, 56; 779-827.
- Bergh M.L.E.**, Hooghwinkel G.J.M. & van den Eijnden D.H. (1983) "Biosynthesis of the O-glycosidically linked oligosaccharide chains of fetuin. Indication for a α -N-acetylgalactosaminide α -2,6-sialyltransferase with a narrow acceptor specificity in fetal calf liver." *J. Biol. Chem.*, 258; 4730-4736.
- Bergh M.L.E.** & van den Eijnden D.H. (1983) "Aglycon specificity of fetal calf liver and ovine and porcine submaxillary gland α -N-acetylgalactosaminide α -2,6 sialyltransferase." *Eur. J. Biochem.*, 136; 113-118.
- Binétruy B.**, Smeal T. & Karin M. (1991) "Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain." *Nature*, 351; 122-127.
- Blanken W.M.** & van den Eijnden D.H. (1985) "Biosynthesis of terminal Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-R oligosaccharide sequence on glycoconjugates." *J. Biol. Chem.*, 260; 12927-12934.
- Bolscher J.G.M.**, van der Bijl, Neefjes J.J., Hall A., Smets L.A. & Ploegh H.L. (1988) "*Ras* (proto)oncogene induces N-linked carbohydrate modification: temporal relationship with induction of invasive potential." *EMBO J.*, 7; 3361-3368.

- Bondy G.P.**, Wilson S. & Chambers A.F. (1985) "Experimental metastatic ability of H-*ras*-transformed NIH3T3 cells." *Cancer Res.*, 45, 6005-6009.
- Bonfil R.D.**, Reddel R.R., Ura H., Reich R., Fridman R., Harris C.C. & Klein-Szanto A.J.P. (1989) "Invasive and metastatic potential of a v-Ha-*ras*-transformed human bronchial epithelial cell line." *J. Natl. Cancer Inst.*, 81; 587-594.
- Bos J.L.** (1989) "*ras* oncogene in human cancer: a review." *Cancer Res.*, 49; 4682-4689.
- Bosmann H.B.**, Boeber G.F., Brown A.E., Case K.R., Gersten D.M., Kimmerrer T.W. & Hone A. (1973) "Biochemical parameters correlated with tumour cell implantation." *Nature*, 246; 487-490.
- Bovari T.** (1914) "zur Frage der Entstehung Malinger Tumoren." Jean, Germany: Fischer.
- Bradford M.M.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, 72; 248-252.
- Breitart R.E.**, Andreadis A. & Nadal-Ginard B. (1987) "Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes." *Annu. Rev. Biochem.*, 56; 467-495.
- Broach J.R.** & Deschesnes R.J. (1990) "The function of RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Adv. Cancer Res.*, 54; 79-139.
- Buck C.A.**, Glick M.C. & Warren L. (1970) "A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed Hamster cells." *Biochemistry*, 9; 4567-4576.
- Capon D.J.**, Seeburg P.H., Mc Grath J.P., Hayflick J.S., Edman U., Levinson A. & Goeddel D.V. (1983) "Activation of Ki-*ras* 2 genes in human colon and lung carcinomas by two different point mutation." *Nature*, 304; 507-513.
- Collard J.G.**, Schijven J.F., Bikker A., La Riviere G., Bolscher J.G.M. & Roos E.D. (1986) "Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas." *Cancer Res.*, 46; 3521-3527.
- Colley K.J.**, Lee E.U., Adler B., Browne J.K. & Paulson J.C. (1989) "Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide." *J. Biol. Chem.*, 264; 17619-17622.
- Compere S.J.**, Baldaci P. & Jaenish R. (1988) "Studies of oncogenes in transgenic mice." *Biochim. Biophys. Acta*, 948; 129-149.
- Conradt H.S.**, Hane K. & Morr M. (1988) "Purification to homogeneity of a

porcine liver Gal(β 1-3)GalNAc-R α -2,3-sialyltransferase." In: *Proc. of Japanese-German Symp. on Sialic Acids*. Schauer R. and Yamakawa T. eds., pp. 104-105.

- Cook G.M.W.**, Heard D.H. & Seaman G.V.F. (1961) "Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature*, 191; 44-47.
- Crocker P.R.**, Kelm S., Dubois C., Martin B., McWilliam A.S., Shotton D.M., Paulson J.C. & Gordon S. (1991) "Purification and properties of sialoadhesin, asialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages." *EMBO J.*, 10; 1661-1669.
- Dennis J.W.** (1988) "Asn-linked oligosaccharides processing and malignant potential." *Cancer Surveys*, 7; 573-595.
- Dennis J.W.**, Carver J.P. & Schachter H. (1984) "Asparagine-linked oligosaccharides in murine tumor cells: comparison of a WGA-resistant non-metastatic mutant and a related WGA-sensitive metastatic line." *J. Cell Biol.*; 1034-1044.
- Dennis J.W.**, Kosh K., Bryce D.M. & Breitman M.L. (1989) "Oncogenes conferring metastatic potential induce increased branching of Asn-linked oligosaccharides in rat2 fibroblasts." *Oncogene*, 4; 853-860.
- Dennis J.W.** & Laferté S. (1989) "Oncodevelopmental expression of -GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β 1-branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas." *Cancer Res.*, 49; 945-950.
- Dennis J.W.**, Laferté S., Waghorne C., Breitman M.L. & Kerbel R.S. (1987) " β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis." *Science*, 236; 582-585.
- Diamond M.I.**, Miner J.N., Yoshinaga S.K. & Yamamoto K.R. (1990) "Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element." *Science*, 249; 1266-1272.
- Dobrossy L.**, Pavelic Z.P. & Bernacki R.J. (1981) "A correlation between cell surface sialyltransferase, sialic acid and the implantability of B16 murine melanoma." *Cancer Res.*, 41; 2262-2266.
- Downward J.**, Riehl R., Wu L. & Weinberg R.A. (1990) "Identification of a nucleotide exchange-promoting activities for p21^{ras}." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87; 5998-6002.
- Duncan J.R.** & Kornfeld S. (1988) "Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus." *J. Cell. Biol.*, 106; 617-628.
- Easton E.W.**, Bolscher J.G.M. & van den Eijnden D.H. (1991) "Enzymatic amplification involving glycosyltransferases forms the basis for the

- increased size of asparagine-linked glycans at the surface of NIH3T3 cells expressing the N-ras proto-oncogene." *J. Biol. Chem.*, 266; 21674-21680.
- Egan S.E.**; McClarty G.A., Jarolim L., Wright J.A., Spiro I., Hager G. & Greenberg A.H. (1987) "Expression of H-ras correlates with metastatic potential: evidence for direct regulation of the metastatic phenotype in 10T1/2 and NIH3T3 cells." *Molec. Cell. Biol.*, 7; 830-837.
- Ellis C.**, Moran M., McCormick F. & Pawson T. (1990) "Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases." *Nature*, 343; 377-381.
- Faillard H.** (1989) "The early history of sialic acids." *Trends Biochem. Sci.*, 14; 237-241.
- Fearon E.R.** & Vogelstein B. (1990) "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell*, 61; 759-767.
- Feldman M.** & Eisenbach L. (1989) "Pourquoi une cellule devient-elle métastatique ?" *Pour la Science*, 135; 30-38
- Fidler I.J.** & Balch C.M. (1987) "The biology of cancer. Metastasis and implications for therapy." *Current Problems in Surgery*, 24; 129-209.
- Finne J.**, Burger M.M. & Prieels J.P. (1982) "Enzymatic basis for a lectin resistant phenotype: increase in a fucosyltransferase in mouse melanoma cells." *J. Cell Biol.*, 92; 277-282.
- Fournet B.**, Montreuil J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J.F.G., Binette J.P. & Schmid K. (1978) "Determination of the primary structures of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma α 1-acid glycoprotein by 360-MHz ^1H NMR spectroscopy and permethylation analysis." *Biochemistry*, 17; 5206-5214.
- Fraenkel D.G.** (1985) "On ras gene function in yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82; 4740-4744.
- Fraker P.J.** & Speck J.C. Jr (1978) "Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80; 849-857.
- Franks D.J.**, Durkin J.P. & Whitfield I.F. (1989) "Protein kinase C and a viral K-RAS protein cooperatively enhance the response of adenylate cyclase to stimulators." *J. Cell Physiol.*, 140; 409-417.
- Gibbs J.B.**, Schaber M.D., Allard W.J., Sigal I.S. & Scolnick E.M. (1988) "Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85; 5026-5030.
- Gillespie W.**, Kelm S., Pang M., Paulson J. & Baum L. (1991) "Differential expression of the Gal β 1- \rightarrow 3GalNAc α 2- \rightarrow 3 sialyltransferase correlates with

PNA reactivity in human cortical and medullary thymocytes." Poster présenté aux Conférences Philippe Laudat, Bischenberg-Obernai, France, 20-24 octobre 1991.

- Gillespie W.**, Kelm S. & Paulson J.C. (1992) "Cloning and expression of the Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, 267; 21004-21010.
- Goustin A.S.**, Jeof E.B., Shipley G.D. & Moses H.L. (1986) "Growth factors and cancer." *Cancer Res.*, 46; 1015-1029.
- Goyette M.**, Petropoulos C.J., Shank P.R. & Fausto N. (1983) "Expression of a cellular oncogene during liver regeneration." *Science*, 219; 510-512.
- Grand R.J.A.** & Owen D. (1991) "Review article. The biochemistry of *ras* p21." *Biochem. J.*, 279; 609-631.
- Gross H.J.**, Rose U., Krause J.M., Paulson J.C., Schmid K., Feeney R.E. & Brossmer R. (1989) "Transfer of synthetic sialic acid analogues to N- and O-linked glycoprotein glycans using four different mammalian sialyltransferases." *Biochemistry*, 28; 7386-7392.
- Grundmann U.**, Nerlich C., Rein T. & Zettlmeissl G. (1990) "Complete cDNA sequence encoding human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase." *Nucleic Acids Res.*, 18; 667.
- Gu T.J.**, Gu X.B., Ariga T. & Yu R.K. (1990) "Purification and characterization of CMP-NeuAc:GM1 (Gal β 1-4GalNAc) α 2-3 sialyltransferase from rat brain." *FEBS Let.*, 275; 83-86.
- Hakomori S.** & Kannagi R. (1983) "Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers." *JNCI*, 71; 231-251.
- Haubruck H.** & McCormick F. (1991) "Ras p21: effects and regulation." *Biochim. Biophys. Acta*, 1072; 215-229.
- Hill S.A.**, Wilson S. & Chambers A.F. (1988) "Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-*ras*-transformed NIH3T3 cells." *J. Natl. Cancer Inst.*, 80; 484-490.
- Jeanloz R.W.** & Codrington J.F. (1976) "Biological roles of sialic acids." Rosenberg A. ed. *Plenum Press, New York*, pp. 201-238.
- Joziassse D.H.**, Bergh M.L.E., Hart H.G.J., Koppen P.L. Hooghwinkel G.J.M. & van den Eijnden D.H. (1985) "Purification and enzymatic characterization of a CMP-sialic acid: β -galactosyl-1,3-N-acetylgalactosaminide α -2,3-sialyltransferase from human placenta." *J. Biol. Chem.*, 260 4941-4951.
- Joziassse D.H.**, Schiport W.E.C.M., van den Eijnden D.H., van Buik J.A., van Halbeek H. & Vliegthart J.F.G. (1987) "Branch specificity of bovine

colostrum CMP-sialic acid : Gal(β 1-4)GlcNAc-R α -2,6-sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, 262; 2025-2033.

Kahn S.M., Jiang W., Culbertson T.A., Weinstein I.B., Williams G.M., Tomita N. & Ronai Z. (1991) "Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-*ras* genes via 'enriched' PCR amplification." *Oncogene*, 6; 1079-1083.

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G. & Clamp J.R. (1975) "Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylglycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides." *Biocgem. J.*, 151; 491-495.

Kaplan D.R., Morrison D.K., Wong G., McCormick F. & Williams L.T. (1990) "PDGF β -receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex." *Cell*, 61; 125-133.

Kaplan H.A., Woloski B.M.R.N.J., Hellman M. & Jamieson J.C. (1983) "Studies of the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal β 1-4GlcNAc α 2-6 sialyltransferase from liver." *J. Biol. Chem.*, 258, 11505-11509.

Kemp R.B. (1970) *J. Cell Sci.*, 6; 751-766.

Kijima-Suda I., Miyamoto Y., Toyoshima S., Itoh M. & Osawa T. (1986) "Inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid: nucleoside conjugate having sialyltransferase inhibiting activity." *Cancer Res.*, 46; 858-862.

Kitayama H., Sugimoto Y., Matsuzaki T., Ikawa Y. & Noda M. (1989) "A *ras*-related gene with transforming suppressor activity." *Cell*, 56; 77-84.

Kushner I. & Mackiewicz A. (1987) "Acute phase proteins as disease markers." *Dis. Markers*, 5; 1-11.

Lammers G. & Jamieson J.C. (1988) "The role of a cathepsin D-like activity in the release of Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase from rat liver Golgi membranes during the acute-phase response." *Biochem. J.*, 256; 623-631.

Lammers G. & Jamieson J.C. (1989) "Studies on the effect of lysosomotropic agents on the release of Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase from rat liver slices during the acute-phase response." *Biochem. J.*, 261; 389-393.

Lance P., Lau K.M. & Lau J.T.Y. (1989) "Isolation and characterization of a partial cDNA for a human sialyltransferase 1." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 164; 225-232.

Land H., Parada L.F. & Weinberg R.A. (1983) "Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires two cooperating oncogenes." *Nature*,

304; 596-602.

- Leder A.**, Pattengale P.K., Kuo A., Stewart T.A. & Leder P. (1986) "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice : multiple neoplasms and normal development." *Cell*, 45; 485-495.
- Lee W.H.**, Murphree A.L. & Benedict W.F. (1984) "Expression of the N-myc gene in primary retinoblastoma." *Nature*, 309; 458-460.
- Lee E.U.**, Roth J. & Paulson J.C. (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.
- Leevers S.J.** & Marshall C.J. (1992) "Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21 ras oncoprotein." *EMBO J.*, 11; 569-574.
- Leff S.E.**, Rosenfeld G. & Evans R.M. (1986) "Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing." *Annu. Rev. Biochem.*, 55; 1091-1117.
- Le Marer N.**, Laudet V., Svensson E.C., Cazlaris H., van Hill B., Lagrou C., Stéhelin D., Montreuil J., Verbert A. & Delannoy P. (1992) "The c-Ha-ras oncogene induces increased expression of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells." *Glycobiology*, 2; 49-56.
- Livingston B.D.**, Jacobs J.L., Glick M.C. & Troy F.A. (1988) "Extended polysialic chains (n>55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells." *J. Biol. Chem.*, 263; 9443-9448.
- Loucheux-Lefebvre M.H.** (1987) "Activation des oncogènes par mutation ponctuelle." *Médecine/sciences*, 3; 33-37.
- Lowry O.H.**, Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.*, 193; 265-275.
- Margolis B.**, Li M., Koch A., Mohammadi M., Hunutz D.R., Zilberstein A., Ullrich A., Pawson T. & Schlessinger J. (1990) "The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma." *EMBO J.*, 9; 4375-4380.
- Martin G.A.**, Viskochil D., Bollag G., McCabe P.C., Crosier W.J., Haubruck H., Conroy L., Clark R., O'Connell P., Cawthon R.M., Innis M.A. & McCormick F. (1990) "The GAP-related domaine of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21." *Cell*, 63; 843-849.
- McGrath J.P.**, Capon D.J., Smith D.H., Chen E.Y., Seeburg P.H., Goeddel D.V. & Levinson A. (1983) "Structure an organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene." *Nature*, 304; 501-

506.

- Melkerson-Watson L.J.** & Sweeley C.C. (1991) "Purification to apparent homogeneity by immunoaffinity chromatography and partial characterization of the G_{M3} ganglioside-forming enzyme, CMP-sialic acid:lactosylceramide $\alpha 2,3$ -sialyltransferase (SAT-1), from rat liver Golgi." *J. Biol. Chem.*, 266; 4448-4457.
- Molloy C.J.**, Bottaro D.P., Fleming T.P., Marshall M.S., Gibbs J.B. & Aaronson S.A. (1989) "PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein." *Nature*, 342; 711-714.
- Morello D.** & Babinet C. (1989) "Oncogènes et développement." *Médecine/sciences*, 5; 16-23.
- Muller W.J.**, Sinn E., Pattengale P.K., Wallace R. & Leder P. (1988) "Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated *c-neu* oncogene." *Cell*, 54; 105-115.
- Munro S.** (1991) "Sequences within an adjacent to the transmembrane segment of α -2,6-sialyltransferase specify Golgi retention." *EMBO J.*, 10; 3577-3588.
- Nemansky M.** & van den Eijnden D.H. (1992) "Bovine colostrum CMP-NeuAc: Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc-R α (2 \rightarrow 6)-sialyltransferase is involved in the synthesis of the terminal NeuAc α (2 \rightarrow 6)GalNAc β (1 \rightarrow 4)GlcNAc sequence occurring on N-linked glycans of bovine milk glycoproteins." *Biochem. J.*, 287; 311-316.
- Nemansky M.** & van den Eijnden D.H. (1993) "Enzymatic characterization of CMP-NeuAc : Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-R α 2 \rightarrow 3-sialyltransferase from human placenta." *Glycoconj. J.*, 10; sous presse.
- Nicolson G.L.** (1982) "Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells." *Biochim. Biophys. Acta*, 695; 113-176.
- Nicolson G.L.**, Birdwell C.R., Brunson K.W., Robbins J.C., Beattie R. & Fidler I.J. (1977) "Cell interactions in the metastatic process: some cell surface properties associated with successful blood-borne tumor spread." *Cell and tissue interactions*, J.W. Lash and M.M. Burger eds., Raven Press, New York, pp. 225-241.
- Nilsson B.**, Norden N.E. & Svensson S. (1979) "Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin." *J. Biol. Chem.*, 254; 4545-4553.
- Nusse R.** (1988) "The *int* genes in mammary tumorigenesis and in normal development." *Trends Genet.*, 4; 291-295.
- O'Hanlon T.** & Lau K.M. (1992) "Analysis of kidney mRNAs expressed from the rat β -galactoside $\alpha 2,6$ -sialyltransferase gene." *Glycobiology*, 2; 257-266.
- O'Hanlon T.**, Lau K.M., Wang W.C. & Lau J.T.Y. (1989) "Tissue-specific



expression of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. Transcript heterogeneity predicts a divergent polypeptide." *J. Biol. Chem.*, 264; 17389-17394.

Passaniti A. & Hart G.M. (1988) "Cell surface sialylation and tumor metastasis." *J. Biol. Chem.*, 263; 7591-7603.

Paulson J.C., Beranek W.E. & Hill R.L. (1977) "Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose." *J. Biol. Chem.*, 252; 2356-2362.

Paulson J.C. & Colley K.J. (1989) "Minireview. Glycosyltransferases." *J. Biol. Chem.*, 264; 17615-17618.

Paulson J.C., Weinstein J. & Schauer A. (1989) "Tissue-specific expression of sialyltransferases." *J. Biol. Chem.*, 264; 10931-10934.

Paulson J.C., Weinstein J., Ujita E.L., Riggs K.J. & Lai P.H. (1987) "The membrane-binding domain of a rat liver Golgi sialyltransferase." *Biochem. Soc. Trans.*, 15; 618-620.

Perucho M., Forrester K., Almoquera C., Kahn S., Lama C., Shibata D., Arnheim N. & Grizzle W.E. (1989) "Expression and mutational activation of the c-K-ras gene in human carcinomas." *Cancer Cells*, 7; 137-141.

Peterson G.L. (1977) "Modified procedure for protein assay." *Anal. Biochem.*, 83; 346-356.

Pierce M. & Arango J. (1986) "Rous sarcoma virus-transformed Baby Hamster Kidney cells express higher levels of Asn-linked tri- and tetra-antennary glycopeptides containing {GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man} and poly-N-acetyllactosamine sequences that Baby Hamster Kidney cells." *J. Biol. Chem.*, 261; 10772-10777.

Polley M.J., Phillips M.L., Wayner I., Nudelman E., Singhal A.K., Hakomori S.I. & Paulson J.C. (1991) "CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88; 6224-6228.

Poste G. & Fidler I.J. (1980) "The pathogenesis of cancer metastasis." *Nature*, 283; 139-145.

Rademacher T.W., Parekh R.B. & Dwek R.A. (1988) "Glycobiology." *Annu. Rev. Biochem.*, 57; 785-838.

Radinsky R., Kraemer P.M., Proffitt M.R. & Culp L.A. (1988) "Clonal diversity of the Kirsten-ras oncogene during tumor progression in athymic nude mice: mechanism of amplification and rearrangement" *Cancer Res.*, 48; 4941-4953.

Rearick J.I., Sadler J.E., Paulson J.C. & Hill R.L. (1979) "Enzymatic

characterization of β -D-galactoside α 2,3-sialyltransferase from porcine submaxillary gland." *J. Biol. Chem.*, 254; 4444-4451.

Reedijk M., Liu X.Q. & Pawson T. (1990) "Interactions of phosphatidylinositol kinase, GTPase-activating protein (GAP), and GAP-associated proteins with the colony-stimulating factor 1 receptor." *Mol. Cell. Biol.*, 10; 198-200.

Roth J. (1987) "Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells." *Biochem. Biophys. Acta*, 906; 405-436.

Roth J., Taatjes D.J., Lucocq J.M., Weinstein J. & Paulson J.C. (1985) "Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation." *Cell*, 43; 287-295.

Roth J., Taatjes D.J., Weinstein J., Paulson J.C. Greenwell P. & Watkins W.M. (1986) "Differential subcompartmentation of terminal glycosylation in the Golgi apparatus of intestinal absorptive and goblet cells." *J. Biol. Chem.*, 261; 14307-14312.

Rüther U., Garber C., Komitowski D., Müller R. & Wagner E.F. (1987) "Deregulated *c-fos* expression interferes with normal bone development in transgenic mice." *Nature*, 325; 412-416.

Rutishauser V., Acheson A., Hall A.K., Mann D.M. & Sunshine J. (1988) "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." *Science*, 240; 53-57.

Rutishauser U., Hoffman S. & Edelman G. (1982) "Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79; 685-689.

Sadler J.E. (1984) "Biology of Carbohydrates" (Ginsburg V. & Robbins P.W. eds) Vol. 2, pp. 87-131, John Wiley & sons, New York.

Sadler J.E., Rearick J.I. & Hill R.L. (1979a) "Purification to homogeneity and enzymatic characterization of an α -N-acetylgalactosaminide α 2-6 sialyltransferase from porcine submaxillary glands." *J. Biol. Chem.*, 254; 5934-5941.

Sadler J.E., Rearick J.I., Paulson J.C. & Hill R.L. (1979b) "Purification to homogeneity of a β -galactoside α 2-3 sialyltransferase and partial purification of an α -N-acetylgalactosaminide α 2-6 sialyltransferase from porcine submaxillary glands." *J. Biol. Chem.*, 254; 4434-4443.

Sambrook J., Fritsch E.J. & Maniatis T. (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.

Santer U.V., De Santis R., Hard K.J., van Kuik J.A., Vliegenthart J.F.G., Won B. & Glick M.C. (1989) "N-linked oligosaccharides changes with

oncogenic transformation require sialylation of multiantennae." *Eur. J. Biochem.*, 181; 249-260.

- Santer U.V.**, Gilbert F. & Glick M.C. (1984) "Change in glycosylation of membrane glycoproteins after transfection of NIH3T3 with human tumor DNA." *Cancer Res.*, 44; 3730-3735.
- Schachter H.** (1991) "Enzymes associated with glycosylation." *Current Opinion in Structural Biol.*, 1; 755-765.
- Schachter H.** & Roden L. (1973) in: Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis (Fishman, W.H. eds.), Vol. 3, pp 1-149. New York: Academic Press.
- Schauer R.** (1982) "Sialic acids: chemistry, metabolism and function." *Cell Biology Monographs*, 10; Springer-Verlag, New York.
- Schonenberger C.A.**, Andres C.A., Groner B., van der Valk M., Lemeur M. & Gerlinger P. (1988) "Targeted c-myc expression in mammary glands of transgenic mice induces tumors with consecutive milk protein gene transcription." *EMBO J.*, 7; 169-175.
- Schweisguth O.** (1979) "Les tumeurs solides de l'Enfant." Paris, Flammarion.
- Selki M.**, Sato H., Liotta L.A. & Schiffmann E. (1991) "Comparison of autocrine mechanisms promoting mobility in two metastatic cell lines: human melanoma and ras-transfected NIH3T3 cells." *Int. J. Cancer*, 49; 717-720.
- Shaper J.H.** & Shaper N.L. (1992) "Enzymes associated with glycosylation." *Current Biol.*, 2; 701-709.
- Shih T.Y.**, Papageorge A.G., Stokes P.E., Weeks M.O. & Scolnick E.M. (1980) "Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21^{src} protein of Harvey murine sarcoma virus." *Nature*, 287; 686-691.
- Shimizu K.**, Birnbaum D., Ruley M.A., Fasano O., Suard Y., Edlund L., Taparowsky E., Goldfarb M. & Wigler M. (1983) "Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1." *Nature*, 304; 497-500.
- Sinn E.**, Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R. & Leder P. (1987) "Coexpression of MMTV/v-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergic action of oncogenes *in vivo*." *Cell*, 49; 465-475.
- Slamon D.J.** & Cline M.J. (1984) "Expression of cellular oncogenes during embryonic and fetal development of the mouse." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81; 7141-7145.
- Slebos R.J.C.**, Kibbelaar R.E., Dalesio O., Kooistra A., Stam J., Meijer C.J.L.M., Wagenaar S.S., Vanderschueren R.G.J.R.A., Van Zandwijk N., Mooi W.J., Bos J.L. & Rodenhuis S. (1990) "K-ras oncogene activation as

- a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung." *New Engl. J. Med.*, 323; 561-565.
- Smets L.A.** & van Beek W.P. (1983) "Glycoprotein modification after transformation with oncogenic viruses." *Structural Carbohydrates in the Liver*, Popper H., Reuttler W., Gudat F. & Kottgen E. eds., MTP Press, Lancaster, pp. 325-333.
- Smit V.T.H.B.M.**, Boot A.J.M., Smits A.M.M., Fleuren G.J., Conelisse C.J. & Bos J.L. (1988) "K-ras codon 12 mutations occur frequently in pancreatic adenocarcinomas." *Nucl. Acids Res.*, 16; 7773-7782.
- Szepetowski P.**, Perucca-Lostanlen D. & Gaudray P. (1991) "Amplification, proto-oncogènes et cancers humains." *Médecine/sciences*, 7; 14-21.
- Stacey D.W.**, Watson T., Kung H.F. & Curran T. (1987) Microinjection of transforming *ras* protein induces *c-fos* expression." *Molec. Cell. Biol.*, 7; 523-527.
- Stanley P.** (1984) "Glycosylation mutants of animal cells." *Ann. Rev. Genetics*, 18; 525-552.
- Stéhelin D.**, Guntaka R.V., Varmus H.E. & Bishop J.M. (1976a) "Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by ASV." *J. Mol. Biol.*, 101; 349-365.
- Stéhelin D.**, Varmus H.E., Bishop J.M. & Vogt P.K. (1976b) "DNA related to the transforming gene(s) of ASV is present in normal avian DNA." *Nature*, 260; 170-173.
- Stéhelin D.** (1988) "Dissection moléculaire des cancers." *Bull. Int. Pasteur*, 86; 225-242.
- Stewart T.A.**, Pattengale P.K. & Leder P. (1985) "Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MMTV/myc fusion genes." *Cell*, 38; 627-637.
- Sticher U.**, Gross H.J. & Brossmer R. (1991) "Purification and characterization of $\alpha(2-6)$ -sialyltransferase from human liver." *Glycoconj. J.*, 8; 45-54.
- Svensson E.C.**, Conley P.B. & Paulson J.C. (1992) "Regulated expression of $\alpha 2,6$ -sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP." *J. Biol. Chem.*, 267; 3466-3472.
- Svensson E.C.**, Soreghan B. & Paulson J.C. (1990) "Organization of the β -galactoside $\alpha 2,6$ -sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation." *J. Biol. Chem.*, 265; 20863-20868.
- Taatjes D.J.**, Roth J., Weinstein J. & Paulson J.C. (1988) "Post-Golgi apparatus localization and regional expression in Rat intestinal sialyltransferase detected by immunoelectronmicroscopy with polypeptide epitope-purified antibody." *J.*

Biol. Chem., 263; 6302-6309.

- Tabin C.J.**, Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R. & Chang E.H. (1982) "Mechanism of activation of a human oncogene." *Nature*, 300; 143-149.
- Takiguchi Y.**, Takahashi Y., Kuriyama T. & Miyamoto T. (1992) "NIH3T3 transfectant containing human K-*ras* oncogene shows enhanced metastatic activity after *in vivo* tumor growth or co-culture with fibroblasts." *Clin. Exp. Metastasis*, 10; 351-360.
- Tsai M.H.**, Yu C.L. & Stacey D.W. (1990) "A cytoplasmic protein inhibits the GTPase activity of H-*Ras* in a phospholipid-dependent manner." *Science*, 250; 982-985.
- Trahey M.** & McCormick (1987) "A cytoplasmic protein stimulates normal N-*ras* p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." *Science*, 238; 542-545.
- Trahey M.**, Wong G., Halenbeck R., Rubinfeld B., Martin G.A., Ladner M., Long C.M., Crosier W.J., Watt K., Koths K. & McCormick F. (1988) "Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta." *Science*, 242; 1697-1700.
- Van Pelt J.**, Dorland L., Duran M., Hokke C.H., Kamerling J.P. & Vliegthart J.F.G. (1989) "Transfer of sialic acid in α 2-6 linkage to mannose in Man β 1-4GlcNAc and Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc by the action of Gal β 1-4GlcNAc α 2-6-sialyltransferase." *FEBS Lett.*, 256; 179-184.
- Varki A.** (1992) "Diversity in the sialic acids." *Glycobiology*, 2; 25-40.
- Venkatesh V.C.** & Ballard P.L. (1991) "Perspective : Glucocorticoids and gene expression." *American J. of Respiratory Cell & Molecular Biology.*, 4; 301-303.
- Vogel U.S.**, Dixon R.A., Schaber M.D., Diehl R.E., Marshall M.S., Scolnick E.M., Sigal I.S. & Gibbs J.B. (1988) "Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic *ras* p21." *Nature*, 335; 90-93.
- Vogelstein B.**, Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M.M. & Bos J.L. (1988) "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *New Engl. J. Med.*, 319; 525-532.
- Wang X.C.**, O'Hanlon T.P. & Lau J.T.Y. (1989) "Regulation of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone." *J. Biol. Chem.*, 264; 1854-1859.
- Wang X.C.**, O'Hanlon T.P., Young R.F. & Lau J.T.Y. (1990a) "Rat β -galactoside α 2,6-sialyltransferase genomic organization: alternate

promoters direct the synthesis of liver and kidney transcripts."

Glycobiology, 1; 25-31.

Wang X.C., Smith T.J. & Lau T.Y. (1990b) "Transcriptional regulation of the liver β -galactoside α 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids." *J. Cell Biol.*, 265; 17849-17853.

Wang X.C., Vertino A., Eddy R.L., Byers M.G., Jani-Sait S.N., Shows T.B. & Lau J.T.Y. (1993) "Chromosome mapping and organization of the human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene." *J. Biol. Chem.*, 268; 4355-4361.

Watson J.D. (1973) "Le cancer, vu par un généticien." dans "Biologie moléculaire de gène." Inter European Eds. Amsterdam, P.541

Wen D.X., Livingston B.D., Medzihradzky K.F., Kelm S., Burlingame A.L. & Paulson J.C. (1992a) "Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning." *J. Biol. Chem.*, 267; 21011-21019.

Wen D.X., Svensson E.C. & Paulson J.C. (1992b) "Tissue-specific alternative splicing of the β -galactosidase α 2,6-sialyltransferase gene." *J. Biol. Chem.*, 267; 2512-2518.

West M., Kung H.F. & Kamata T. (1990) "A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of *ras* proteins." *FEBS Lett.*, 259; 245-248.

Weinstein J., de Souza-Silva U. & Paulson J.C. (1982a) "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., de Souza-Silva U. & Paulson J.C. (1982b) "Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine." *J. Biol. Chem.*, 257; 13845-13853.

Weinstein J., Lee E.U., McEntee K., Lai P.H. & Paulson J.C. (1987) "Primary structure of β -galactosidase α 2,6-sialyltransferase." *J. Biol. Chem.*, 263; 17735-17743.

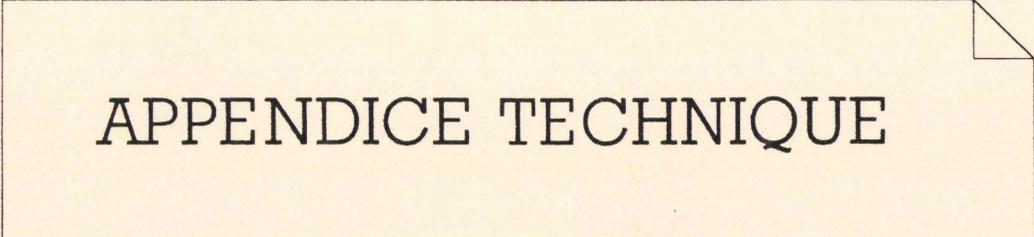
Wickner W.T. & Lodish H.F. (1985) "Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes." *Science*, 230; 400-407.

Wittinghofer A. & Pai E.F. (1991) "The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch." *Trends Biol.*, 16; 382-391.

Wolfman A. & Macacra I.G. (1990) "A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21^{ras}." *Science*, 248; 67-69.

Woodgett J.R. (1992) "Finding the stepping stones downstream of Ras." *Current Biol.*, 2; 357-358.

- Xu G.**, O'Connell P., Viskochil D., Cawthon R., Robertson M., Culver M., Dunn D., Stevens J., Gesteland R., White R. & Weiss R. (1990) "The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP." *Cell*, 62; 599-608.
- Yamashita K.**, Ohkura T., Tachibana Y., Takasaki S. & Kobata A. (1984) "Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis." *J. Biol. Chem.*, 259; 10834-10840.
- Yamashita K.**, Tachibana Y., Ohkura T. & Kobata A. (1985) "Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation." *J. Biol. Chem.*, 260; 3963-3969.
- Yogeeswaran G.** & Salk P.L. (1981) "Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines." *Science*, 212; 1514-1516.



APPENDICE TECHNIQUE

I - CULTURES CELLULAIRES.

A - Culture des cellules.

1 - Préparation du milieu de culture.

Les différentes lignées cellulaires utilisées : fibroblastes de Souris NIH3T3, fibroblastes de Rat Fischer FR3T3, ainsi que les cellules transfectées par pSV2neo (NIHneo) ou par le plasmide pSV2neoEJ (NIHras, FRras) ont été cultivées dans un milieu de Eagle modifié selon Dulbecco (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de Veau foetal (Gibco) et des antibiotiques, préparé comme suit : à un flacon de 100 ml de DMEM 10 x, on ajoute 50 ml de solution de bicarbonate de sodium à 40 g/l et 800 ml d'eau pour préparations injectables. Le pH est ajusté à 7,4 par de la soude 1 N. Sont ensuite ajoutés : 1 ml de solution 100 x d'acides aminés non essentiels de Eagle (MEM, Gibco), 1 ml de solution de d-biotine à 1 mg/ml, 10 ml de solution de L-glutamine à 30 mg/ml, 1 ml de solution de Gentamicine à 50 mg/ml (Gibco) et 1 ml de solution de Fungizone (Amphotéricine B, Gibco). Le milieu est ensuite complété à un litre par de l'eau stérile, filtré sur membrane d'acétate de cellulose (Corning, 0,22 μ m) et conservé à +4°C.

Avant utilisation le milieu est complété par 10% de sérum de Veau foetal décomplémenté par chauffage à 50°C pendant 45 min.

Toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire. Toutes les solutions et le milieu de culture sont pré-chauffés à 37°C avant leur utilisation. Toutes les cultures sont effectuées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ dans des flacons de culture en plastique de 75 ou 175 cm².

2 - Décongélation d'une souche de cellules.

L'ampoule est prélevée du container d'azote liquide et décongelée rapidement par agitation dans un bain-marie à 37°C. Le bouchon de l'ampoule est ensuite lavé à l'alcool, séché et passé à la flamme avant d'être ouvert. A l'aide d'une pipette stérile de 2 ml, les cellules sont remises doucement en suspension et transvasées dans un tube conique Falcon de 15 ml. 10 ml de milieu sont doucement ajoutés aux cellules et le tout est très lentement homogénéisé par aspirations successives dans la pipette. Le tube est ensuite centrifugé 10 min à 1,000 rpm et le culot

cellulaire est remis doucement en suspension dans 2 ml de milieu de culture.

Dans le cas des lignées cellulaires normales (NIH3T3, NIHneo et FR3T3), les 2 ml de suspension cellulaire sont directement transvasés à l'aide de la pipette dans un flacon de culture Falcon de 75 cm² contenant 8 ml de milieu de culture. Dans le cas des cellules transformées (NIHras et FRras), les 2 ml sont répartis dans 2 flacons de 75 cm² contenant chacun 9 ml de milieu de culture.

3 - Repiquage et entretien d'une souche cellulaire.

a) Solution de Versène trypsique.

2 l de solution de Versène (EDTA disodique 2,5 g, NaCl 16 g, KCl 400 mg, Na₂HPO₄·12H₂O 5,74 g, K₂HPO₄ 400 mg, NaOH 1 N 2 ml) sont autoclavés 20 min à 120°C et stockés à -20°C aliquotés par flacon de 200 ml. A 200 ml de solution stérile de Versène sont ajoutés : 200 mg de trypsine (Gibco), 200 µl de NaOH 1 N, 200 µl de Gentamycine et 500 µl de Fungizone. La solution est ensuite préfiltrée sur filtre Millex-HA de 0,45 µm puis filtrée stérilement sur filtre Millex-GV de 0,22 µm (Millipore) et finalement répartie en tubes Falcon stériles par fraction de 30 à 35 ml et stockée à -20°C.

b) Repiquage des cellules.

Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu est aspiré et le tapis cellulaire est lavé doucement par 5 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) stérile. 1 ml de solution de Versène trypsique est ensuite délicatement versé dans le flacon afin de recouvrir complètement le tapis cellulaire puis aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur. Les cellules sont remises à 37°C jusqu'à décollement. Lorsque les cellules sont décollées de la boîte de culture, elles sont remises en suspension dans 3 à 4 ml de milieu de culture. La suspension cellulaire est ensuite répartie à raison de 1 ml par flacon de 75 cm² contenant préalablement 9 ml de milieu de culture.

B - Congélation des cellules.

Après décollage des cellules par la solution de Versène trypsique, les cellules sont remises en suspension dans un milieu de congélation (constitué de 8 ml de milieu de culture sans sérum de Veau foetal, de 1

ml de diméthyl sulfoxyde et de 1 ml de sérum de Veau foetal décomplémenté) préparé extemporanément et à raison de 1 ml par flacon de 75 cm². Ainsi, les cellules sont remises en suspension et réparties dans des ampoules cryogéniques à raison de 1 ml de suspension cellulaire par ampoule. Les ampoules sont ensuite refroidies 35 min à 4°C, puis congelées une demie journée et une nuit à -80°C pour finalement être conservées dans l'azote liquide.

C - Culture des cellules en présence de dexaméthasone et/ou de RU 38.486.

24 h après le repiquage, la dexaméthasone ou le RU 38.486 ont été ajoutés stérilement à une concentration finale de 1 µM et de 0 à 2 µM respectivement, à partir de solutions mères éthanoliques. Les cellules sont récupérées après 48 heures de culture en présence des stéroïdes.

Pour les expériences d'inhibition de la transcription, 10 mg d'actinomycine D sont ajoutés par ml de milieu, 48 heures après l'addition de la dexaméthasone.

II - MESURE DES ACTIVITES α1,3-GALACTOSYL- ET SIALYLTRANSFERASIQUES.

A - Préparation des homogénats cellulaires.

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont décollées mécaniquement (par grattage) dans du PBS et lavées plusieurs fois dans le même tampon. Les cellules sont ensuite lysées par 1 ml par flacon de 175 cm² de tampon cacodylate/HCl 10 mM pH 6,5 contenant 1% de Triton X100, 0,5 mM de DTT, 20% de glycérol et 5 mM de MnCl₂. Après 20 min de contact dans la glace et centrifugation 15 min à 10,000g (4°C), les culots sont éliminés et les surnageants sont conservés à -20°C moins de 2 semaines en vue de leur utilisation pour les mesures des activités enzymatiques.

B - Détermination de la concentration protéique des homogénats cellulaires.

La quantité de protéines présentes dans les différents homogénats cellulaires est déterminée par la méthode de Lowry (1951) modifiée par Peterson (1977).

- Préparation du réactif A: 25 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4% et 25 ml de tartrate de potassium $[\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 0,8% sont mélangés à 50 ml de carbonate de sodium à 20%. Le réactif A est préparé par le mélange d'un volume de cette solution, d'un volume de NaOH 0,8 N, d'un volume de dodécyl sulfate de sodium (SDS) 10% et d'un volume d'eau. Ce réactif peut se conserver 4 semaines à 4°C et à l'obscurité mais nécessite d'être resolubiliser à chaud avant utilisation.

- Préparation du réactif B: un volume de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu (Merk) est dilué au 1/5 dans de l'eau. Ce réactif se conserve à 4°C et à l'obscurité.

20 à 40 μl d'homogénat cellulaire sont ajustés à 1 ml par de l'eau distillée. Après ajout de 100 μl de déoxycholate de sodium 0,15%, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 100 μl de solution d'acide trichloracétique (TCA) à 72%. Après agitation puis centrifugation à 5,000 g pendant 5 min, le surnageant est éliminé par aspiration. Après addition d'1 ml d'eau, le culot protéique est solubilisé, sous agitation, par 1 ml de réactif A et laissé 10 min à température ambiante. Sont ajoutés ensuite 500 μl de réactif B et les tubes sont laissés 30 min à l'obscurité afin de laisser la coloration se développer. La concentration protéique des homogénats est ensuite déterminée contre une gamme de sérumalbumine bovine variant de 5 à 100 μg , par lecture de l'absorbance à 750 nm.

C - Préparation des accepteurs.

1 - Désialylation des accepteurs.

Les différents accepteurs de transfert de galactose et d'acide sialique sont désialylés par hydrolyse acide ménagée.

200 mg de fétuine de sérum de Veau foetal (type III) ou 200 mg d'orosomucoïde isolée de plasma humain sont solubilisés dans 20 ml d' H_2SO_4 0,1 N. La désialylation s'effectue à 80°C pendant 1 heure. Après refroidissement, les solutions sont neutralisées par addition d'1/10 de volume de soude 1 N et les asialo-protéines sont débarassées

de l'acide sialique libre par dialyse contre de l'eau 48 heures à 4°C sous agitation.

Les glycopeptides de la sérotransferrine humaine et de l'orosomucoïde sont désialylés dans les mêmes conditions de chauffage après dissolution dans l'acide sulfurique 1 N dans un rapport de 1 ml pour 15 mg de glycopeptides. Après neutralisation, les glycopeptides sont séparés de l'acide sialique libre par gel filtration sur colonne de Bio-Gel P2 équilibrée dans l'eau. Les fractions asialo-glycopeptidiques sont ensuite repérées par une révélation à l'orcinol sulfurique (2 g/l d'H₂SO₄ 20%) après dépôt sur couche mince.

2 - Analyse des accepteurs désialylés.

Après concentration et lyophilisation, les structures glycaniques des accepteurs protéiques et glycopeptidiques sont ensuite analysées par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire (2,2 mm x 25 m) de Silicone OV101 après méthanolyse et triméthylsilylation (Kamerling et al., 1975). La capacité acceptrice de ces accepteurs désialylés est exprimée par la concentration en résidus de galactose terminaux en position terminale non-réductrice.

D - Détermination des activités α 1,3-galactosyl- et sialyltransférases.

1 - Détermination de l'activité α 1,3-galactosyltransférase.

- Le milieu d'incubation comprend, pour un volume final de 120 μ l:
- 40 μ l d'homogénat cellulaire
 - 50 μ l de tampon d'incubation : cacodylate de sodium 240 mM pH 6, 120 mM en MnCl₂, 0,48 M en galactose, 12 mM en ATP et contenant 1,6% de Triton X100 et 0,24% de sérumalbumine bovine.
 - 25 μ l de solution d'accepteur exogène à 10 mg/ml
 - 5 μ l d'une solution d'UDP-[U-¹⁴C]-Gal 53 μ M (15,65 mCi/mmol).

Les incubations sont effectuées de 2 à 8 heures à 37°C puis la réaction est arrêtée en diluant les incubats à 500 μ l par de l'eau. Les accepteurs galactosylés sont ensuite séparés de l'[U-¹⁴C]-Gal par chromatographie d'échange d'ions sur colonnes d'1 ml de Dowex 1x8 (100-200 mesh, forme Cl⁻) (Blanken & van den Eijnden, 1985). La radioactivité des éluats est enfin déterminée par comptage en scintillation liquide.

2 - Détermination des activités sialyltransférasiques.

Le milieu d'incubation comprend, pour un volume final de 120 μ l :

- 40 μ l d'homogénat cellulaire
- 50 μ l de tampon cacodylate de sodium 240 mM pH 6,5, 0,48 mM en galactose, 1,4 mM en 2,3-déhydro-2-déoxy-Neu5Ac et contenant 1,6% de Triton X100 et 0,24% de sérumalbumine bovine
- 25 μ l d'une solution d'accepteur exogène à 10 mg/ml
- 5 μ l d'une solution de CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac 53 μ M (15,65 mCi/mmol).

Les incubations sont effectuées de 2 à 8 heures à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée en déposant les échantillons dans la glace. Selon la nature de l'accepteur, la quantité d'acide sialique transférée est déterminée de manière différente : dans le cas des accepteurs protéiques, l'incubat est directement déposé sur papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante pendant 24 heures dans le solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5/5/1/3; v/v) et le transfert de résidus d'acide sialique sur les asialo-glycoprotéines restées au point de dépôt, est déterminé par comptage en scintillation liquide. Dans le cas des asialo-glycopeptides et des structures oligosaccharidiques, l'excès de CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac est hydrolysé par incubation à 100°C pendant 10 min. Après centrifugation 5 min à 4,000 rpm, les incubats sont déposés sur papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante dans le même solvant que précédemment et pendant des temps variables selon la taille de l'accepteur.

III - β -ELIMINATION DES O-GLYCANES DE LA FÊTUINE.

A - Détermination du pourcentage de transfert de l'acide sialique.

Après incubation de l'asialo-fêtuine en présence des homogénats cellulaires pendant 24 heures à 37°C, un aliquot de l'incubat est déposé sur papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante dans les mêmes conditions que précédemment afin de déterminer le pourcentage de transfert d'acide sialique selon les homogénats.

B - β -élimination des O-glycannes de la fêtuine néosialylée.

La fêtuine néosialylée est ensuite purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2 équilibrée dans l'acétate

de pyridine 0,1 M. Après concentration par évaporation à sec par évaporateur rotatif, les fractions d'éluion correspondant à la glycoprotéine radioactive sont soumises à une β -élimination en milieu réducteur. Le résidu sec est repris par 3 ml de soude 0,1 N auxquels sont ajoutés 110 mg de BH_4Na (1 M final). La réaction de β -élimination des structures O-glycanniques est effectuée par incubation à 45°C pendant 48 h. La réaction est arrêtée par ajout de Dowex 50x8 (Cl^-) jusqu'à l'obtention d'un pH de 6. L'échantillon est ensuite débarrassé de la Dowex et rincé par 2 ml d'eau puis évaporé à sec par évaporation rotative et enfin co-distillé 3 fois avec du méthanol afin d'éliminer toute trace de borate.

C - Séparation des O-glycannes β -éliminés.

Le résidu sec est repris par 2 ml d'acétate de pyridine 0,1 M puis déposé sur colonne de Bio-Gel P4 équilibrée dans l'acétate de pyridine 0,1 M afin de séparer les O-glycannes β -éliminés des N-glycosylpeptides. Le transfert d'acide sialique sur chacune de ces structures glycanniques est déterminé par comptage de la radioactivité en scintillation liquide.

IV - ETUDE DE LA GALACTOSYLATION ET DE LA SIALYLATION DES GLYCOPROTEINES CELLULAIRES.

A - Marquage à l'iode des lectines.

Le marquage des lectines à l' ^{125}I est réalisé par la méthode à l'Iodogen (1,3,4,6-tétrachloro-3 α ,6 α -diphényl glycoluryle) (Pierce) décrite par Fraker et Speck (1978).

500 μ l de solution de lectine à 1 mg/ml de PBS sont déposés dans un tube à hémolyse en verre préalablement recouvert par 100 μ g d'Iodogen: 100 μ l d'une solution d'Iodogen à 1 mg/ml de chloroforme sont répartis dans des tubes à hémolyse en verre puis le chloroforme est évaporé sous courant d'azote.

2 μ l de solution d' $[^{125}I]IMS30$ (5 mCi/50 μ l, Amersham) sont ensuite ajoutés et laissés en contact 15 min sous agitation dans la glace. La réaction de marquage est arrêtée par addition de 50 μ l de solution d'INA 2,5 M. Les lectines marquées sont enfin séparées de l'excès d'iode par

gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 préalablement équilibrée par 25 ml d'une solution de séralbumine bovine à 1% dans le PBS.

B - Préparation des homogénats cellulaires.

De l'ordre de 10^6 cellules environ sont solubilisées dans 200 μ l de PBS contenant 1% de Triton X100, 5 mM de PMSF (phényl méthyl sulfonyl fluoryl) et 5 mM de DTT (dithiothréitol) à 4°C pendant 30 min sous agitation constante. Les lysats obtenus sont ensuite centrifugés 15 min à 1,500 rpm puis la concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford (1976) vis-à-vis d'une gamme étalon de séralbumine bovine.

C - Séparation des glycoprotéines cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS-PAGE).

1 volume de surnageant est mélangé a un volume de "tampon échantillon" (Tris/HCl 0,3 M pH 8,9, 5% SDS, 5% β -mercapto-éthanol, 20% glycérol, 0,001% bleu de bromophénol) et incubé 2 min à 100°C. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (en présence de SDS) est effectuée à 40 mA sur un gel composé d'un gel de concentration à 5% et un gel de séparation préparé par un gradient 5-24% en présence de SDS. 50 μ g de protéines sont déposés par piste.

Après l'électrophorèse les protéines ont été soit visualisées par coloration au bleu de Coomassie soit électro-transférées sur membrane de nitrocellulose.

D - Evaluation de la galactosylation et de la sialylation des glycoprotéines cellulaires.

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées par électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose (BA85-0,45 μ m, Schleider & Schuell) dans un tampon Tris 20 mM, Glycine 150 mM, méthanol 20% pendant une nuit à 80 mA et à 4°C.

Après transfert, les membranes sont incubées 2 h à température ambiante dans une solution de PVP (polyvinylpyrrolidon K30, Aldrich-Chemie) à 2% dans du PBS. L'incubation avec les lectines s'effectuent durant 4 h dans la même solution à une concentration de 10^6 dpm/ml. Les

membranes sont ensuite lavées plusieurs fois dans du PBS, puis 5 min dans une solution de Tween à 0,05% dans du PBS avant d'être rincée finalement par du PBS et séchées pour être autoradiographiées à -70°C.

V - ANALYSE DES ARN PAR NORTHERN-BLOT.

A - Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux des différentes lignées cellulaires sont extraits par une méthode au thiocyanate de guanidium et au chlorure de césium (Sambrook et al., 1989). Tous les produits, ainsi que la vaisselle utilisée sont préalablement traités au DEPC 1/1000 et autoclavés 1 h à 130°C à 1,5 atm pour prévenir l'éventuelle présence de toute activité ARNasique. Toutes les manipulations sont effectuées avec des gants.

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées par du PBS. Les cellules d'un flacon de 75 cm² sont ensuite lysées par 3 ml d'un tampon d'homogénéisation au thiocyanate de guanidium (5,2 M thiocyanate de guanidium, 25 mM citrate de sodium pH 6,5, 100 mM β-mercapto-éthanol, 0,5% sarkosyl de sodium). Le lysat est homogénéisé par un traitement à l'appareil de Potter (1,500 U/min) jusqu'à l'obtention d'une solution visqueuse. L'ADN nucléaire est coupé par un traitement aux ultra-sons (3 x 1 s, intervalles de repos de ~20s) et cet homogénat est ensuite centrifugé à 10,000 rpm 20 min à 18°C (pour éviter la cristallisation du thiocyanate).

0,10 g de chlorure de césium sont ajoutés par ml de surnageant. Celui-ci est alors ultra-centrifugé sur un coussin d'une solution de chlorure de césium 5,7 M dans 0,01 M d'EDTA pH 7,3 (à raison de 1,2 ml de coussin pour 3,8 ml d'homogénat) à 35,000 rpm pendant 16 h.

Les culots d'ARN sont rincés par de l'éthanol à 70% et homogénéisés par 400 µl de tampon acétate de sodium 3 M pH 5,5, β-mercapto-éthanol 14,3 M, 20% sarkosyl pH 6,1; puis extraits par une extraction phénol/tris-chloroforme (v/v). Enfin, les ARN sont précipités 2 h à -20°C ou 30 min à -80°C par addition d'1/10 du volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2 volumes d'éthanol froid. Les culots sont lavés à l'éthanol 70%, séchés, redissous dans de l'eau et la quantité, ainsi que la pureté de l'ARN sont déterminées par mesure de la DO à 260 nm et à 280 nm.

B - Electrophorèse en gel d'agarose.

200 ml de gel d'agarose 1,5% sont préparés en agitant 30 min à température ambiante et sous hotte: 3 g d'agarose, 124 ml d'eau et 124 μ l de DEPC. Après autoclavage 20 min à 120°C et 1 atm, lorsque le gel a refroidi jusqu'à une température de -60°C, sont ajoutés sous une agitation lente 40 ml de tampon 5 x (MOPS 0,2 M pH7, EDTA 5mM, acétate de sodium 50 mM) et 36 ml de formaldéhyde à 37%.

40 μ g d'ARN total sont déposés par puit dans les conditions suivantes : 40 μ g d'ARN sont repris dans :

- 9 μ l d'eau
- 4 μ l de tampon 5 x
- 7 μ l de formaldéhyde (37%)
- 20 μ l de formamide. Le mélange est incubé 15 min à 65°C puis refroidi dans la glace pour déshybrider l'ARN. Avant le dépôt sur le gel, sont ajoutés 2 μ l de solution de dépôt (glycérol 50%, EDTA 1mM, Bleu de bromophénol 0,4%, xylène cyanol FF 0,4%).

La migration est effectuée 6 h à 6 h 30 à 50 mA et à 80-90 V.

C - "Northern-blotting" des ARN.

Le transfert des ARN s'effectue par northern-blot sur membrane de nitrocellulose (BA85-0,45 μ m, Schleider & Schuell) ou sur membrane de nylon (Boehringer). Ce transfert est effectué une nuit à température ambiante dans les conditions décrites par Sambrook et al. (1989).

Lorsque la membrane utilisée est en nylon, l'ARN transféré est immédiatement covalamment lié par irradiation de la membrane encore humide aux UV (254 nm) pendant 3 min à une distance de 15 cm. La membrane est ensuite rincée 5 min dans une solution de SSC 2 x pour éliminer les oligonucléotides libres.

Lorsque la membrane est en nitrocellulose, elle est tout d'abord séchée 15 min à l'air libre puis cuite 2 h à 80°C.

VI - MARQUAGE DES SONDÉS ET HYBRIDATION DES NORTHERN-BLOTS.

A - Marquage de la sonde de l' α 2,6-sialyltransférase et révélation.

L'ADNc servant de sonde pour visualiser le transcrite de l' α 2,6-sialyltransférase est inséré dans un plasmide exprimé dans des bactéries E. coli. Les étapes de production, d'extraction et de purification de la

sonde sont effectuée classiquement selon les méthodes décrites par Sambrook et al. (1989). Les bactéries sont cultivées en masse, sélectionnées sur un milieu de culture en présence d'antibiotiques et les cellules contenant le vecteur dans lequel est également intégré un gène de résistance aux antibiotiques sont clonées de manière à produire quantitativement le vecteur. Celui-ci est extrait, digéré par des enzymes de restriction au niveau des sites d'insertion de l'ADNc. Ce fragment est ensuite isolé par électrophorèse préparative en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, visualisé et extrait du gel puis purifié grâce à l'utilisation d'un kit "Geneclean" (Bio 101 Inc.) et enfin radio-marqué au ³²P.

1 - Marquage de la sonde.

Le marquage de la sonde de l' α 2,6-sialyltransférase a été effectué selon le protocole d'utilisation du kit de marquage par "oligolabelling" de Pharmacia LKB.

25 à 50 ng d'ADN sont dissous dans du tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) de façon à obtenir un volume final de 34 μ l et sont ensuite dénaturés 2 min à 100°C puis placés dans le glace. Après une brève centrifugation, sont ajoutés:

- 10 μ l de mélange réactionnel
- 5 μ l de [α -³²P]dCTP à 3 000 Ci/mmol
- 49 μ l d'eau
- et 1 μ l de solution de fragment de "Klenow". Le mélange est ensuite incubé 30 min à 37°C. Le rendement de marquage de la sonde est déterminé par comptage en scintillation liquide après coprécipitation d'1 μ l de la solution de marquage avec 50 μ l d'une solution d'ADN de sperme de Saumon par 4 ml d'acide trichloro-acétique (TCA) à 10% et filtration sur filtre en fibre de verre.

2 - Hybridation et autoradiographie.

Le northern-blot est préhybridé dans une boîte de plastique hermétique 2 heures à 42°C sous agitation dans un tampon de préhybridation : SSC 5 x, Denhard 5 x (0,1% de Ficoll type 400 (Pharmacia), 0,1% de PVP, 0,1% de sérum albumine bovine), SDS 0,5%, 200 μ g/ml d'ADN de sperme de Saumon dénaturé. L'étape de préhybridation permet le blocage des sites de fixation non spécifiques.

L'hybridation est effectuée une nuit à 42°C sous agitation avec la sonde marquée au [³²P] préalablement dénaturée par incubation de 2 min à 95°C et 2 min dans la glace. 50 ml de tampon d'hybridation sont préparés par agitation sous hotte de 5 g de sulfate de Dextran dans 25 ml de formamide. Après 3 heures sont ajoutés:

- 12,5 ml de SSC 20 x
- et de l'eau qsp 50 ml.

Les lavages du northern-blot après hybridation se font dans les conditions suivantes:

- 2 fois 10 min à température ambiante dans un tampon SSC 2 x, SDS 0,1%
- 15 min à 65°C dans un tampon SSC 0,1 x, SDS 0,1%
- 2 fois 10 min à 65°C dans le tampon SSC 0,1 x, SDS 0,1%.

Le northern-blot est ensuite autoradiographié à -70°C.

B - Marquage de la sonde de l' α 2,3-sialyltransférase et révélation.

Une séquence d'ADN de plus de 1,600 pb permettant de visualiser le transcrit de l' α 2,3-sialyltransférase est insérée dans un vecteur pBluescript KS (+/-) au niveau de 2 sites de restriction pour Eco R1. Ce vecteur possède en outre le gène de résistance à l'ampiciline qui permettra de sélectionner les bactéries. Le plasmide est intégré dans les bactéries E. coli WM 1100 par une méthode d'électroporation. Pour cela les cellules sont préalablement préparées selon la méthode décrite par Invitrogen Corp.

1 - Préparation des cellules d'E. coli pour l'électroporation.

Une colonie de bactérie E. coli WM 1100 est mise en croissance une nuit dans 10 ml de milieu LB (pour 1 l de milieu LB : 5 g d'extrait de Levure, 10 g de Trypton, 10 g de NaCl dans l'eau; le milieu est ensuite autoclavé 20 min à 121°C). Les 10 ml de culture de nuit sont transvasés dans 1 l de milieu LB et la croissance est poursuivie jusqu'à l'obtention d'une DO \pm 0,5-0,8 à 600 nm. A ce moment les cellules sont en phase exponentielle de croissance. La culture cellulaire est alors refroidie dans la glace pendant 30 min puis centrifugée 15 min à froid à 5,000 rpm. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 l d'eau froide et centrifugé à nouveau 15 min à froid à 5,000 rpm. Le culot de cellules est repris par 500 ml d'eau et centrifugé de la même manière que précédemment.

Le culot cellulaire est cette fois remis en suspension dans 40 ml d'une solution froide de glycérol à 10% dans l'eau, transvasé dans des tubes de cultures de cellules coniques et centrifugé dans un rotor de type SS34 15 min à froid à 5,800 rpm. Chaque culot est resuspendu alors dans 800 μ l de la solution précédente et le tout est réparti en fractions de 50 μ l dans des tubes Eppendorfs stériles qui peuvent être conservés à -70°C jusqu'à utilisation.

2 - Electroporation.

Il est primordial pour cette technique d'électroporation que les cellules restent dans la glace jusqu'à ce que le "pulse" soit appliqué. De plus une fois celui-ci effectué, la solution de SOC doit être ajoutée aux cellules immédiatement afin d'obtenir un bon rendement d'incorporation.

Les cuvettes utilisées sont des cuvettes de 2 mm (Gene Pulser Cuvette de Bio Rad Lab). L'appareil d'électroporation (Gene Pulser, Invitrogen) doit être réglé sur une capacité de 25 μ F, 220 Ohm (Pulse Controller) et une tension de 2,5 kV.

La solution de SOC est une solution de SOB contenant 20 mM de glucose. La solution de SOB est préparée de la façon suivante, pour 1 l:

- à 950 ml d'eau désionisée sont ajoutés:
- 20 g de Bacto-trypton
- 5 g d'extrait de Levures
- 0,5 g de NaCl
- 10 ml de KCl 250 mM

le pH est ajusté à 7 par de la soude 5 N, le volume est ajusté à 1 l par de l'eau désionisée, la solution est autoclavée 20 min à 121°C puis, juste avant l'utilisation, sont ajoutés 5 ml d'une solution stérile de $MgCl_2$ 2 M.

1 à 5 ng d'ADN à transférer, dissous dans l'eau, sont déposés dans un tube Eppendorf placé dans la glace. Les bactéries décongelées lentement doivent être utilisées immédiatement. 40-50 μ l de culture bactérienne sont transvasés et mélangés à la solution d'ADN et laissés 1 min dans la glace. Pendant ce temps les cuvettes d'électroporation congelées et stériles sont placées dans la chambre de "pulse". Après 1 min, les cellules sont déposées dans le fond de la cuvette qui est mise alors en contact avec l'électrode. Un fois le "pulse" appliqué, 1 ml de

SOC est ajouté dans la cuvette et mélangé. Le tout est enfin transféré dans un tube Eppendorf et incubé 1 h à 37°C sous agitation de 225 rpm.

Les bactéries sont ensuite mises en culture à 37°C et sélectionnées en boîte de Pétri sur agar-LB avec un mélange ampiciline/tétracycline. Les plasmides sont ensuite extraits des clones bactériens puis isolés par électrophorèse préparative en gel d'agarose et purifiés selon les conditions classiques (Sambrook *et al.*, 1989).

3 - Préparation de la sonde de l' α 2,3-sialyltransférase.

Le vecteur est ouvert par l'utilisation d'un site de restriction pour Xba1 avoisinant un site d'insertion de la sonde. 20 μ g de vecteur sont mis en incubation 2 h en présence de 40 U de Xba1 dans le tampon approprié à cette enzyme. La réaction de digestion du vecteur est arrêtée en incubant le tube 10 min à 65°C et le mélange réactionnel est gardé une nuit à +4°C.

La pureté du vecteur est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,7% de 75 ml dans les conditions suivantes:

- 0,525 g d'agarose sont dissous dans 67,5 ml d'eau et portés à ébullition jusqu'à l'obtention d'une solution limpide qui est ensuite mise à 50°C pendant 10 min.

Après avoir ajouté 7,5 ml de TBE 10x, la solution est laissée 10 min à 50°C avant d'ajouter 7,5 μ l de BET (bromure d'éthyldium) à 10 mg/ml. Une fois le gel coulé, il est laissé 30 min à température ambiante puis 10 min à +4°C.

1 μ g d'ADN et 5 μ l d'une solution commerciale de témoin de masse moléculaire (HindIII et Eco R1) sont dissous dans le tampon de dépôt 10 x (bleu de bromophénol 0,25%, Xylène Cyanol FF 0,25%, Ficoll type 400 (Pharmacia) 15% dans l'eau) dans les proportions suivantes:

- 2,5 μ l d'échantillon
- 6,5 μ l d'eau
- 1 μ l de tampon de dépôt 10 x.

L'électrophorèse est effectuée 1 h à 1-5 V/cm (100 V pour un gel de 75 ml) dans 1 l de tampon TBE 1 x et les bandes d'ADN sont visualisées sous une lampe UV.

4 - Extraction phénol/chloroforme.

La sonde de l' α 2,3-ST sera utilisée sous sa forme transcrite en ARN après une réaction de transcription effectuée in vitro à partir de l'ADN inséré dans le vecteur. Pour cela la préparation d'ADN nécessite d'être parfaitement pure et débarrassée de toute trace de RNase. Une extraction phénolique/chloroformique de l'ADN est nécessaire consécutivement à un traitement du mélange réactionnel par une protéinase. En outre, toutes ces étapes seront effectuées après traitement des solutions et de la vaisselle au DEPC.

a) Traitement par la protéinase K :

47,5 μ l du mélange de digestion du vecteur par l'enzyme de restriction Xba1 sont incubés 1 h à 1 h 30 à 37°C dans une solution de CaCl₂ 2 mM final contenant 10 μ g/ml de protéinase K.

b) Extraction phénol/chloroforme :

Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est dilué à 100 μ l par de l'eau, puis sont ajoutés successivement 50 μ l de phénol saturé en Tris et 50 μ l d'une solution CHCl₃/alcool isoamylique (24:1). Après mélange énergique jusqu'à l'obtention d'une émulsion, et centrifugation 2 min à 14,000 g, la phase organique inférieure est aspirée et l'opération est répétée une nouvelle fois. La phase aqueuse supérieure est alors transférée dans un tube Eppendorf libre de toute activité RNasique. 100 μ l de la solution CHCl₃/alcool isoamylique sont ajoutés et après centrifugation, la phase aqueuse libre de toute trace de phénol est à nouveau transférée dans un nouveau tube. L'ADN est ensuite précipité par l'addition d'1/10 de volume de NaCl 1,5 M et de 2,5-3 volumes d'éthanol 96%. Après une nuit à -80°C, le tube est centrifugé 15 min à +4°C à 15,000g et le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70%, puis séché à l'air libre et redissous dans 15 μ l d'une solution de TEE (triéthanolamine 10 mM, EDTA 1 mM). La concentration et la pureté de l'ADN sont estimés par mesure de la DO à 260 et 280 nm d'1 μ l de solution dilué dans 500 μ l d'eau.

5 - Transcription in vitro.

La transcription in vitro va permettre le marquage de la sonde à la digoxigénine. En effet l'ARN-polymérase T3 va copier l'ADN linéaire en ARN et grâce à la présence dans le milieu réactionnel d'un nucléotide lié à la digoxigénine, l'ARN transcrit pourra être détecté ultérieurement par un kit de détection.

a) Réaction de transcription : cette réaction de transcription est effectuée grâce à l'utilisation d'un kit de marquage de l'ARN (Boehringer) dans les conditions suivantes:

- 2 μ g de vecteur linéaire sont ajoutés à
- 8 μ l d'eau
- 2 μ l de mélange du nucléotide-TP marqué à la digoxigénine
- 2 μ l de tampon de transcription 10 x
- 2 μ l d'une solution d'ARN-polymérase T3 d'E. coli (40 U/ μ l) (Boehringer)
- 1 μ l d'inhibiteur de RNase.

L'incubation est effectuée 2 h à 37°C. L'ADN ayant servi de "template" est ensuite hydrolysé par incubation 15 min à 37°C en présence de 2 μ l de DNase I. La réaction de transcription est arrêtée par addition de 2 μ l d'EDTA 0,2 M pH 8. L'ARN marqué est précipité par 2,5 μ l de LiCl 4M et 75 μ l d'éthanol. Après 30 min à -80°C, le précipité d'ARN centrifugé à 15,000 g pendant 5 min à +4°C et lavé par 50 μ l d'éthanol à 70%, séché à l'air libre et solubilisé dans 50 μ l de TEE.

b) Quantification du marquage de l'ARN : la quantité d'ARN marqué et nouvellement synthétisé dépend de la quantité, de la taille et de la pureté de l'ADN-template. La quantité d'ARN marqué est estimée par comparaison avec un ARN-contrôle. Pour cela un dot-blot est effectué sur une membrane de nylon non chargée (Qiamembrane, Qiagen) préalablement trempée 1 min dans l'eau puis égouttée. Une gamme de dilution (1/10, 1/100 et 1/1000) est effectuée dans du TEE. 1 μ l de chacune des dilutions est déposé sur la membrane qui est ensuite séchée \pm 15 min à l'air libre puis mouillée dans du SSC 2 x, enveloppée dans du Seran-Wrap, cross-liée 3 min sous UV (254 nm), à nouveau rincée dans du SSC 2 x, préincubée 10 min à 37°C et enfin révélée par autoradiographie. La comparaison des 2 gammes de dilutions (ARN néo-synthétisé et ARN-contrôle) permet d'évaluer la quantité d'ARN marqué.

c) Contrôle de la pureté de la sonde-ARN néomarquée : pour connaître l'état de pureté de la sonde et vérifier l'absence de contamination de la préparation par l'ADN-template, l'ARN est analysé par séparation par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% (75 ml). Le gel est préparé de la façon suivante: 0,9 g d'agarose sont dissous dans 54 ml d'eau bi-distillée, portés à ébullition et laissés à refroidir

jusqu'à 60°C avant d'ajouter 7,5 ml de tampon d'électrophorèse 10 x (0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, 10 mM acétate de sodium, pH 7) et 13,5 ml de formaldéhyde 37%. Le gel une fois coulé est laissé 1 heure à température ambiante avant d'être utilisé.

1 μ l de la solution d'ARN est mélangé à:

- 2,5 μ l de formamide
- 1 μ l de formaldéhyde (37%)
- 0,5 μ l de tampon d'électrophorèse 10 x
- 0,25 μ l de bromure d'éthidium (1 mg/ml) avant d'être incubé 10 min à 65°C et refroidi dans la glace. L'ARN ainsi dénaturé sera complété par 0,5 μ l de tampon échantillon avant d'être déposé sur le gel. La migration s'effectue dans le tampon d'électrophorèse 1 x à 100 V (80-90 mA) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol est migré de 8-9 cm. L'ARN est ensuite visualisé sous lampe UV.

6 - Hybridation d'un northern-blot avec la sonde ARN marquée à la digoxigénine et révélation.

Le northern-blot est préalablement préhybridé 1 h à 55°C dans 40 ml de tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 5 x, agent bloquant 2% (Boehringer), n-laurylsarcosine 0,1%, SDS 0,02%) afin de bloquer les sites de fixation non spécifique.

Avant l'hybridation, 4 μ l de la solution de sonde ARN marquée à la digoxigénine sont dénaturés 10 min à 65°C dans 1 ml de tampon d'hybridation sans formamide puis placés 2 min dans la glace.

L'hybridation du northern-blot est effectuée une nuit à 55°C sous agitation constante dans 40 ml de tampon d'hybridation contenant la sonde dénaturée (dilution 1/10 000).

Le tampon d'hybridation est ensuite éliminé et la membrane de nylon est lavée 2 fois 5 min à température ambiante dans 50 ml de solution SSC 2 x, SDS 0,1% puis 2 fois 15 min à 68°C dans 50 ml de solution SSC 0,1 x, SDS 0,1%.

La membrane est ensuite lavée 5 min dans le **tampon de lavage** : **Tampon 1** (Acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) contenant 0,3% de Tween-20. Puis elle est incubée 30 min dans 100 ml de **tampon 2** (agent bloquant dilué à 1% dans le tampon 1) avant d'être incubée 30 min dans 10 ml de tampon 2 contenant 2 μ l de la solution d'anticorps antidégoxigénine (150 U/ml). Les anticorps non hybridés sont éliminés par lavages: 5 min, 10 min puis 15 min dans 100 ml de tampon de

lavage. Le northern-blot est ensuite équilibré 5 min dans 20 ml de tampon 3 (TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5) avant d'être incubé 5 min dans 10 ml de solution diluée au 1/100 de AMPPD. La membrane est enfin enveloppée humide dans du Seran-Vrap, incubée 15 min à 37°C puis autoradiographiée à température ambiante.

C - Marquage de la sonde oligonucléotidique et révélation des messagers codant pour l' α 2,3ST(O).

1 - Sonde oligonucléotidique utilisée.

La séquence oligonucléotidique que nous avons choisie de faire synthétiser afin de révéler les messagers codant pour l' α 2,3ST(O) est une séquence complémentaire de la séquence d'ADNc entre les nucléosides 715 et 750 et située en dehors de la séquence d'homologie avec les autres sialyltransférases. Cette séquence oligonucléotidique de 36 mer (5'-ATA AAT CAG GAT CTT CTC CTT TTT GAC TTT GAT CTT-3') a été synthétisée par Eurogentec.

2 - Marquage de la séquence oligonucléotidique.

Après purification par chromatographie en phase inverse sur gel de silice (colonnes Sep-Pak C₁₈) selon le protocole décrit par Sambrook et al. (1989), la séquence oligonucléotidique a été marquée à la digoxigénine par utilisation du kit de marquage à la terminal-transférase. A 100 pmol d'oligonucléotide purifié, ont été ajoutés :

- 4 μ l de tampon réactionnel 5 x
- 4 μ l de solution 25 mM de CoCl₂
- 7,7 μ l d'eau stérile
- 1 μ l de solution 1 mM de DIG-dUTP
- 1 μ l de solution 10 mM de dATP
- et 50 U de terminal-transférase.

La réaction de marquage enzymatique a été effectuée à 37°C pendant 15 min puis arrêtée après dépôt du tube 5 min dans la glace, par addition au milieu réactionnel de 5 μ l d'un mélange composé de 1 μ l de glycogène 20 mg/ml dans 200 μ l de solution d'EDTA 0,2 M pH 8.

Les oligonucléotides marqués à la digoxigénine ont ensuite été précipités pendant 1 h à -80°C par addition de 6,25 μ l de LiCl 4 M et de 187,5 μ l d'éthanol absolu froid (-20°C). Après centrifugation à 4°C

pendant 15 min à 14,000 g, le culot a été lavé par 100 µl d'éthanol à 70% et dissous dans 100 µl d'eau stérile.

3 - Contrôle du marquage de la sonde oligonucléotidique.

L'efficacité du marquage de la sonde oligonucléotidique a été visualisée par comparaison avec une solution d'oligonucléotide marquée à la digoxigénine fournie dans le kit de marquage.

Le dot-blot-test a été effectué dans les conditions déjà décrites.

4 - Hybridation moléculaire.

Les northern-blots ont été préalablement préhybridés pendant 1 h 30 à 68°C dans 20 ml de tampon d'hybridation. Les hybridations ont été effectuées une nuit dans 25 ml de tampon d'hybridation (SSC 5 x, 1% de réactif bloquant, 0,1% de N-Laurylsarcosine, 0,2% de SDS) contenant 2 à 10 pmol de sonde oligonucléotidique/ml. L'hybridation a été effectuée à 47°C après calcul de la température selon la formule donnée dans le protocole de marquage. Après lavages 2 fois 5 min à 47°C dans du tampon SSC 2 x contenant 0,1% de SDS et 2 fois 4 min dans du tampon SSC 0,1 x contenant 0,1% de SDS, la révélation de la digoxigénine a été effectuée selon le protocole de détection.

5 - Marquage de cette même sonde oligonucléotidique au ³²P **Phosphore.**

Le marquage de la sonde au ³²P a été effectuée grâce à l'utilisation du même kit de marquage que précédemment avec toutefois quelques variations. A 10 pmol d'oligonucléotide ont été ajoutés :

- 4 µl de tampon réactionnel 5 x,
- 4 µl de solution 25 mM de CoCl₂,
- 1 nmol de d'ATP en solution dans du tampon Tris pH 7,5
- 5 µl de dCTP-[³²P] à 10 mCi/ml et 3 000 Ci/mmol (Amersham),
- 3,7 µl d'eau stérile
- et 50 U de terminale transférase.

D - Marquage de la sonde actine et révélation.

1 - Marquage de la sonde.

La sonde actine utilisée est un oligonucléotide de 27-mer de séquence 5'-GAC GAC GAG CGC AGC GAT ATC GTC ATC-3' spécifique

de la β -actine cytoplasmique de Rat (Clontech). Le marquage de cette sonde a été effectué selon la méthode de marquage des extrémités terminales de la façon suivante:

- 200 ng d'oligonucléotide sont dénaturés dans 15,5 μ l d'eau 1 min à 70°C avant d'être déposés dans la glace. Sont ensuite ajoutés:
- 2,5 μ l de tampon kinase 10 x (0,5 M Tris/HCl pH 7,6, 0,1 M $MgCl_2$, 50 mM DTT, 1 mM Spermidine HCl, 1 mM EDTA (pH 8))
- 5 μ l de ^{32}P -gamma-ATP (à 10 mCi/ml- 10pmol)
- 1 μ l (8 U) de kinase T4. L'incubation est effectuée 1 h à 37°C et la réaction est arrêtée par chauffage 10 min à 68°C.

2 - Hybridation.

La préhybridation du northern-blot est effectuée à 66°C pendant 3 heures dans 40 ml de tampon d'hybridation (SSC 6 x, Denhard 2 x, SDS 0,25%) contenant 4 mg d'ADN de sperme de Saumon préalablement dénaturé 5 min à 100°C et refroidi dans la glace.

La sonde marquée au ^{32}P est dénaturée de la même manière que l'ADN de sperme de Saumon puis est directement ajoutée dans le tampon de préhybridation. L'hybridation est effectuée sous agitation constante une nuit à 66°C.

Avant l'autoradiographie, le northern-blot est lavé 1 h à température ambiante dans 100 ml de tampon SSPE 2 x-SDS 0,05% puis 20 min à 66°C dans 100 ml de tampon SSPE 5 x-SDS 0,1%.

VII - DOSAGE DES RECEPTEURS DES GLUCOCORTICOIDES EXPRIMES DANS LES CELLULES FR3T3 ET FR_{ras}.

A - Cinétiques de fixation de la dexaméthasone par les cellules FR3T3 et FR_{ras}.

Pour chacune des lignées cellulaires, les cellules à confluence, en culture dans un flacon de 75 cm², sont décollées du support et remises en suspension dans 64 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum de Veau fœtal et redistribuées dans une plaque multi-puits de 12 puits (Linbro, 4,5 cm² et 7,5 ml/puit) à raison de 1 ml de solution par puit. Après 2 jours de culture des cellules à 37°C-5% de CO₂, les cellules non-adhérentes sont éliminées par lavages par du milieu DMEM sans sérum de Veau et les cellules adhérentes sont placées 1 h à 37°C-5%

CO₂ dans du milieu DMEM sans sérum de Veau avant le dosage des récepteurs.

Après aspiration du milieu de culture, dans 3 puits de chaque lignée cellulaire sont déposés 500 µl de milieu DMEM contenant de la dexaméthasone tritiée ([1,2,4,6,7-³H]-dexaméthasone, Amersham) à une concentration finale de 2,8 nM ou 500 µl de cette solution contenant de la dexaméthasone froide 200 fois en excès. Après incubation des cellules à 37°C-5% CO₂ pendant 10, 20, 30, 60 et 90 min, l'incorporation du glucocorticoïde dans les cellules est arrêtée par dépôt des plaques de culture dans la glace.

* 200 µl du milieu de culture de chaque puit sont comptés en scintillation liquide afin de déterminer la concentration de dexaméthasone libre réelle.

* Le reste du milieu de culture est ensuite aspiré et les puits sont lavés 5 fois par 1 ml de PBS froid afin d'éliminer toute trace de dexaméthasone libre. Au 6^{ème} lavage les cellules sont laissées 20 min à t° ambiante en contact de 1 ml de PBS afin d'éliminer la plupart des glucocorticoïdes associés aux cellules de façon non saturable.

* Après aspiration du PBS, les cellules adhérentes sont laissées 20 min à t° ambiante sous agitation en contact de 300 µl d'éthanol absolu afin d'extraire la dexaméthasone incorporée dans les cellules. L'extrait éthanolique est déposé dans une fiole de comptage et les puits sont ensuite rincés par 100 µl d'éthanol. Les deux extractions éthanoliques sont comptées ensemble en scintillation liquide afin de déterminer la quantité de glucocorticoïde internalisé. La fixation spécifique de la dexaméthasone est calculée par soustraction de la radioactivité contenue dans l'extrait éthanolique des cellules incubées en présence de la solution diluée à la radioactivité de l'extrait éthanolique des cellules incubées en présence de la solution de dexaméthasone tritiée seule.

B - Dosage des récepteurs exprimés dans chacune des lignées cellulaires.

L'expérimentation a été effectuée selon le même principe que précédemment. Les cellules ont été incubées 90 min à 37°C-5% CO₂ avec des concentrations variables en dexaméthasone tritiée (2, 4, 6, 10, 20, 50 et 100 nM final).



ABSTRACT

The study of sialyltransferase activities in NIH3T3 and FR3T3 cells allowed us to characterize the specific increase of the activity of the CMP-NeuAc: Gal(β 1-4)GlcNAc α -2,6-sialyltransferase (α 1,6ST(N)), enzyme involved in the sialylation of N-glycoproteins, either when the cells were transformed by transfection of the human c-Ha-ras oncogene or when the cells were cultured in the presence of dexamethasone. In both cases, we were able to show that the activation of this enzyme resulted from an elevation of the transcription level of a 4.7 kb mRNA corresponding to one of the three isoforms expressed in rat tissues. The study of the expression of the enzyme after treatment of the ras transformed cells with dexamethasone revealed that the activity of the α 2,6ST(N), already greatly enhanced consecutively to the transforming expression of the p21^{ras}, was not induced anymore by the glucocorticoid. Since we demonstrated that these cells, as well as the normal cells, express the glucocorticoid receptor and are able to bind specifically dexamethasone, this indicates that the loose of control in the transcription of the enzyme by the glucocorticoid receptor pathway is directly consequent to the expression of the ras oncogene in these cells.

We have also demonstrated that the expression of the ras oncogene in FR3T3 cells induces, in addition to the activity of the α 2,6ST(N), a 4 fold decrease in the activity of an another sialyltransferase specific for the core 1 O-linked oligosaccharides and that this decreased activity was related with an inhibition of the expression of the CMP-NeuAc: Gal(β 1-3)GalNAc α -2,3-sialyltransferase.

