

50376
1993
39

50376
1993
39

N° d'ordre : 1084

THÈSE

présentée par

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE**

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Spécialité : BIOCHIMIE

par : FRANCK DELANNOY



**ETUDE DES VARIATIONS
DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES
DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES
LORS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE
ET DU CYCLE MITOTIQUE.**

Soutenue le 16 Février 1993 devant la commission d'examen.

Président : Professeur G. Spik

**Rapporteurs : Docteur M. Aubery
Docteur G. Rebel**

**Examineurs : Docteur M. Collyn-d'Hooghe
Docteur H. Debray
Professeur J. Montreuil**

A mes parents,

A mes frères,

A Sandrine.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL.

Vous m'avez accepté dans votre laboratoire et accordé votre confiance en me laissant le soin de réaliser ces travaux. Vous m'avez communiqué vos grandes qualités pédagogiques et votre haute compétence scientifique. Vous avez pris en charge la correction de ce mémoire et m'avez fait l'honneur de participer à ce jury. Je ne saurais oublier ce que je vous dois et vous communique ici ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur M. AUBERY.

Vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse et, par vos conseils et encouragements, m'avez permis de la soutenir dans de bonnes conditions, qu'il me soit permis ici de vous exprimer mes plus vifs remerciements.

A Monsieur le Docteur G. REBEL.

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et d'y avoir apporté un grand intérêt en contribuant grandement à l'animation de la discussion. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur G. Spik.

Vous m'avez fait l'honneur et la gentillesse d'assumer avec compétence la présidence de ce jury, permettez moi de vous témoigner ici toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. Verbert.

Je vous remercie vivement pour tous vos encouragements et pour avoir effectué un bref intérim de luxe en tant que président de jury puis d'avoir efficacement assuré une passation de pouvoirs pour me permettre de soutenir à la date prévue.

A Madame le Docteur M. COLLYN-D'HOOGHE.

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et supporté durant ces quelques années. Je vous remercie vivement, ainsi que J. Goutas et D. Lantoine, pour votre gentillesse et votre compétence qui m'ont beaucoup aidé dans la partie la plus ardue de ce travail, c'est à dire tenter de domestiquer des cellules et de surmonter leurs caprices afin de leur imposer les miens. De plus, vous avez largement participé, avec compétence et célérité, aux corrections de ce mémoire. Soyez assurés, vous et votre équipe, de ma profonde et sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur H. DEBRAY.

Henri, durant ces cinq années tu m'as enseigné la rigueur et la patience en me permettant de débiter deux sujets, entreprise laborieuse mais ô combien passionnante. J'ai su apprécier à leur juste valeur ta conception du travail, à l'épreuve du temps, et ta perpétuelle minutie au cours de leur mise en oeuvre. Je t'en suis reconnaissant.

A Monsieur le Professeur B. LASSALLE.

A chaque fois que tu le pouvais, tu étais disponible pour analyser mes cellules au SAMBA ou pour discuter des résultats. J'ai apprécié tes grandes qualités humaines, pédagogiques et scientifiques. Sois assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R. CACAN.

Tu as accepté d'assurer une partie des corrections de ce mémoire et de me donner à ce sujet quelques conseils pertinents. Je tiens à t'exprimer ici ma sincère gratitude.

Je remercie également l'équipe enseignante que j'ai eu le plaisir de côtoyer en TP au cours de trois années, malheureusement sans suite.

Encore un grand merci à Jo Celen, toujours disponible, notamment lors de la mise en forme de ce mémoire.

Je tiens également à remercier vivement tous ceux qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces années, notamment Yves Plancke, toujours présent quand on a besoin de lui, Nelly et Nathalie, mes deux "passeuses" préférées, Sandrine, Sophie et Jean François pour leurs encouragements, et tous les membres du C9 ayant contribué à la bonne ambiance au cours de mon séjour, cinq années cela ne s'oublie pas.

Et enfin, un grand salut à Lord Baden Powell qui m'a permis "d'être prêt" à aborder toutes les étapes de ce parcours de manière optimiste.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Henri Debray, dans le groupe des Biomembranes (Responsable : Professeur Emérite Jean Montreuil) du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires. Directeur : Professeur André Verbert).

Nous avons bénéficié de la collaboration de Madame le Docteur Maud Collyn-d'Hooghe (Institut de Recherches sur le Cancer de Lille), ainsi que de l'aide technique de Madame Myriam Lecocq.

SOMMAIRE /

SOMMAIRE.....	2
ABBREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
GENERALITES.....	12

1ère partie : LA MITOSE

I. LE CYCLE MITOTIQUE DES CELLULES EUCARYOTES.....	13
I.1. Les phases du cycle mitotique.....	16
I.1.1. La phase G ₁	16
I.1.2. La phase S.....	20
I.1.3. La phase G ₂	22
I.1.4. La mitose.....	23
a. <i>La prophase</i>	23
b. <i>La (pré)métaphase</i>	24
c. <i>L'anaphase</i>	25
d. <i>La télophase</i>	25
I.2. La régulation du cycle cellulaire.....	26
I.2.1. Le MPF (Maturation Promoting Factor).....	27
I.2.2. Les cyclines.....	28
I.2.3. La protéine p34 ^{cdc2}	31
I.3. La transformation cellulaire.....	34
II. SYNCHRONISATION DES CELLULES EUCARYOTES.....	37
II.1. Enrichissement d'une population cellulaire en phase G ₁ /G ₀	40
II.2. Enrichissement d'une population cellulaire en phase S.....	40
II.3. Enrichissement d'une population cellulaire en phase G ₂	44
II.4. Enrichissement d'une population cellulaire en phase M.....	44

2ème PARTIE : LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES

I. ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	48
II. STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCOLIPIDES.....	52

II.1. Les glycosphingolipides.....	52
II.1.1. Les cérébrosides.....	53
II.1.2. Les gangliosides.....	53
II.2. Les glycolipides.....	54
III. STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCOPROTEINES.....	57
III.1. Composition globale.....	58
III.2. Les O-glycosylprotéines.....	59
III.3. Les N-glycosylprotéines.....	60
III.3.1. Les glycannes de type oligomannosidique.....	61
III.3.2. Les glycannes de type N-acétyllactosaminique.....	61
III.3.3. Les glycannes hybrides.....	63
IV ROLES DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES.....	64
IV.1. Glycoconjugués et récepteurs membranaires.....	64
IV.2. Glycoconjugués et inhibition de contact.....	66
IV.3. Antigénicité des glycoconjugués membranaires.....	67
IV.4. Glycoconjugués et perméabilité membranaire.....	69
V. CYCLE CELLULAIRE ET GLYCOSYLATION DE SURFACE.....	70
V.1. Implications des glycannes dans la transformation cellulaire....	70
V.2. Les glycoconjugués et la différenciation cellulaire.....	74
V.3. Les glycoconjugués et le cycle cellulaire.....	77
V.3.1. Résultats globaux.....	77
a. <i>Variations de la sialylation.....</i>	<i>77</i>
b. <i>Utilisation de lectines.....</i>	<i>78</i>
c. <i>Mesure d'activités enzymatiques.....</i>	<i>79</i>
d. <i>Utilisation de radioéléments.....</i>	<i>79</i>
V.3.2. Glycolipides et cycle cellulaire.....	80
V.3.3. Glycoprotéines et cycle cellulaire.....	80
a. <i>Intermédiaires de synthèse.....</i>	<i>80</i>
b. <i>Structures glycaniques de surface.....</i>	<i>82</i>
VI. CONCLUSIONS.....	84

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre 1 : CHOIX DES METHODES DE SYNCHRONISATION

I. MATERIELS ET METHODES.....	85
I.1. Modèles expérimentaux.....	85
I.1.1. BHK-21.....	85
I.1.2. NIH 3T3.....	85
I.1.3. Fixation.....	87
I.2. Analyses au cytomètre SAMBA.....	87
I.2.1. Matériel.....	87
I.2.2. Coloration des cellules.....	88
I.3. Analyses au cytofluorimètre de flux.....	89
I.3.1. Matériel.....	89
I.3.2. Coloration des noyaux.....	90
I.4. Interprétation.....	90
II. SYNCHRONISATIONS.....	91
II.1. Synchronisation en phase G₁.....	91
II.2. Synchronisation en phase S.....	94
II.2.1. Double blocage par la thymidine.....	94
II.2.2. Blocages chimiques.....	95
II.3. Synchronisation en phase G₂.....	95
II.3.1. Synchronisation par sédimentation.....	95
II.3.2. Blocages chimiques.....	100
II.4. Synchronisation en phase mitotique.....	100
II.4.1. Synchronisation par agitation.....	100
II.4.2. Blocages chimiques.....	106
III. CONCLUSIONS.....	106

Chapitre 2 : CHOIX DU PROTOCOLE DE FRACTIONNEMENT. CLHP D'AFFINITE

I. CONSIDERATIONS GENERALES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR LECTINES.....	109
I.1. Chromatographie d'affinité conventionnelle et à haute performance	
I.1.1. Remarques générales sur les procédés d'immobilisation....	109
I.1.2. Chromatographie d'affinité conventionnelle.....	110
I.1.3. Chromatographie d'affinité à haute performance.....	112
I.2. Les lectines utilisées et leurs performances.....	113
II. MATERIEL.....	118
II.1. Appareils.....	118
II.2. Réactifs.....	119
II.3. Lectines.....	119
II.4. Tampons d'équilibrage des colonnes.....	119
III. TECHNIQUES UTILISEES.....	120
III.1. Origine des glycopeptides témoins.....	120
III.2. Immobilisation des lectines sur silice.....	124
III.2.1. Préparation d'une silice-diol.....	124
III.2.2. Détermination de la quantité de diol fixée.....	124
III.2.3. Oxydation de la fonction diol.....	125
III.2.4. Immobilisation des lectines.....	125
IV. FRACTIONNEMENTS SUR CONCANAVALINE A.....	126
IV.1. Résultats.....	126
IV.2. Conclusion.....	133
V. FRACTIONNEMENTS SUR LECTINE DE LENTILLE IMMOBILISEE.....	133
V.1. Résultats.....	133
V.2. Conclusion.....	142
VI. FRACTIONNEMENTS SUR LECTINE DE SUREAU (SNA-I).....	142
VI.1. Résultats.....	142
VI.2. Conclusion.....	145
VII. CONCLUSIONS.....	145

Chapitre 3 : FRACTIONNEMENTS DES STRUCTURES GLYCANNIQUES

I. MATERIEL ET METHODES.....	147
I.1. Marquages radioactifs métaboliques.....	147
I.2. Préparation des glycopeptides.....	148
I.2.1. Délipidation des culots cellulaires.....	148
I.2.2. Hydrolyse pronasique.....	150
II. FRACTIONNEMENTS.....	150
II.1. Chromatographie de gel filtration sur Ultrogel ACA 202.....	150
II.1.1. Mode opératoire.....	150
II.1.2. Résultats.....	151
a. <i>Comparaison des structures glycaniques de fibroblastes en différentes phases de croissance.....</i>	<i>151</i>
b. <i>Comparaison des structures glycaniques présentes dans des cellules quiescentes ou en phase mitotique.....</i>	<i>154</i>
c. <i>Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes murins interphasiques.....</i>	<i>156</i>
II.1.3. Conclusion.....	159
II.2. Etude des glycanes liés O-glycosidiquement.....	159
II.2.1. Protocole.....	160
a. <i>β-élimination en milieu réducteur.....</i>	<i>160</i>
b. <i>Élimination des protéoglycanes.....</i>	<i>160</i>
c. <i>Fractionnement sur Biogel P4.....</i>	<i>161</i>
II.2.2. Résultats.....	161
a. <i>Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes en différentes phases de croissance... </i>	<i>161</i>
b. <i>Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes en fonction des phases du cycle cellulaire.....</i>	<i>163</i>
c. <i>Conclusion.....</i>	<i>165</i>
II.3. Etude des N-glycosylpeptides.....	165
II.3.1. Chromatographie d'affinité sur Concanavalline A immobilisée.....	165
II.3.1.1. Mode opératoire.....	165

II.3.1.2. Résultats.....	168
a. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides membranaires de fibroblastes en phase exponentielle de croissance ou quiescents.....	168
b. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides membranaires de fibroblastes normaux en fonction des phases du cycle cellulaire.....	168
c. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides de fibroblastes murins transformés en fonction des phases du cycle cellulaire.....	173
II.3.1.3. Conclusions.....	173
II.3.2. Chromatographie d'affinité sur lectine de lentille (LCA) immobilisée.....	176
II.3.2.1. Mode opératoire.....	176
II.3.2.2. Résultats.....	177
a. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides membranaires de fibroblastes en phase exponentielle de croissance ou quiescents.....	177
b. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides membranaires de fibroblastes normaux ou transformés en phases mitotique ou G_1/G_0	180
α. Fibroblastes normaux BHK-21.....	180
β. Fibroblastes transformés HSV.....	181
c. Comparaison des <i>N</i> -glycosylpeptides membranaires de fibroblastes normaux ou transformés et enrichis dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	185
α. Fibroblastes normaux NIH 3T3.....	185
β. Fibroblastes transformés NIH ras.....	188
II.3.2.3. Conclusions.....	191
II.3.3. Chromatographie d'affinité sur lectine de sureau (SNA-I) immobilisée.....	191
II.3.3.1. Mode opératoire.....	191
II.3.3.2. Résultats.....	192
a. Fibroblastes normaux NIH 3T3.....	192
b. Fibroblastes transformés NIH ras.....	193
II.3.3.3. Conclusions.....	193
II.3.4. Estimation du degré de sialylation des structures biantennées de type N-Acétyllactosaminique.....	193

II.3.4.1. Mode opératoire.....	193
II.3.4.2. Résultats.....	195
II.3.4.3. Conclusion.....	196
II.3.5. Fractionnement des structures oligomannosidiques.....	198
II.3.5.1. Mode opératoire.....	198
II.3.5.2. Résultats.....	199
II.3.5.3. Conclusion.....	199
III. CONCLUSIONS.....	201
CONCLUSIONS GENERALES.....	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	207

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

Asn : asparagine

ConA : Concanavoline A (lectine de *Canavalia ensiformis*)

CPM : coups par minute

DPM : désintégrations par minute

FEC 10mM : fraction retenue sur conA et éluee par une solution d' α -D-méthylglucoside 10mM

FEC 0,5M : fraction retenue sur ConA et éluee par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,5M

FEL 20mM : fraction retenue sur LCA et éluee par une solution d'éthylènediamine 20mM

FES 0,3M : fraction retenue sur SNA et éluee par une solution de lactose 0,3M

FNRC : fraction non retenue sur ConA

FNRL : fraction non retenue sur LCA

FNRS : fraction non retenue sur SNA

Fuc : fucose

Gal : galactose

GalNAc : N-Acétyle-Galactosamine

Glc : glucose

GlcNAc : N-Acétyle-Glucosamine

HPLAC : High Performance Liquid Affinity Chromatography

LCA : *Lens culinaris* agglutinin (lectine de lentille)

Man : mannose

NeuAc : Acide N-Acétyle-Neuraminique

NeuGc : Acide N-Glycolyle-Neuraminique

PBS : Phosphate Buffered Saline

SNA-I : *Sambucus nigra* agglutinin bark (lectine de sureau)

INTRODUCTION/

Les cellules eucaryotes sont hérissées de structures glycaniques nombreuses et variées, enracinées dans la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de protéines et de lipides.

Dans le cas des cellules animales, ces glycoprotéines et glycolipides subissent de profondes modifications au cours de phénomènes biologiques naturels ou pathologiques comme l'embryogenèse ou la cancérisation.

Ces perturbations structurales sont provoquées par des modifications de l'équilibre entre les activités glycosyltransférasiques et glycosidasiques impliquées de près ou de loin dans le métabolisme des glycannes.

L'objectif de notre travail concerne l'étude de modifications éventuelles de ces glycoconjugués membranaires au cours du principal événement biologique vécu par la cellule : le cycle mitotique. Autrement dit, existe-t-il une régulation du métabolisme des glycoprotéines associée à chacune des phases du cycle cellulaire ?

De plus, sachant que, lors de la comparaison de cellules transformées et de cellules normales, ces dernières sont cultivées à confluence (pour en obtenir de grandes quantités), il est possible que les différences de glycosylation enregistrées proviennent plutôt de la comparaison de cellules au repos (cellules normales) à des cellules en croissance très active (cellules transformées). Ainsi, Glick et Buck (1973) ont montré que les glycopeptides exprimés à la surface cellulaire durant la métaphase sont similaires à ceux exprimés après transformation virale. Notre étude pourrait nous permettre de savoir si les différences observées proviennent bien de la transformation cellulaire.

Après avoir résumé l'état actuel de nos connaissances sur le cycle cellulaire puis sur les glycoconjugués membranaires, nous décrivons les méthodes de synchronisation cellulaire que nous avons choisis d'utiliser, le protocole de fractionnement des glycopeptides membranaires avec, en particulier, la mise au point d'une technique de fractionnement par Chromatographie Liquide à Haute Performance d'affinité sur lectines immobilisées, pour finalement exposer les résultats que nous avons obtenus par l'analyse des glycopeptides membranaires de populations cellulaires enrichies en chacune des phases du cycle mitotique.

Ces travaux ont fait l'objet des communications et de la publication suivantes :

XVIIIème Forum des jeunes chercheurs de Tours (3-6 Sept. 91).

F. Delannoy, M. Collyn-d'Hooghe, H. Debray et J. Montreuil.

"Modifications de la structure des glycoprotéines à la surface de fibroblastes en fonction des phases du cycle cellulaire."

Regard sur la Biochimie, Août 1991, n°5.

XIXème Forum des jeunes chercheurs de Caen (7-10 Juil. 92).

F. Delannoy, M. Collyn-d'Hooghe, H. Debray et J. Montreuil.

"Modifications de la structure des glycannes des glycoprotéines à la surface de fibroblastes normaux et transformés en fonction des phases du cycle cellulaire."

Regard sur la Biochimie, Juillet 1992, n°3.

F. Delannoy, J. Montreuil and H. Debray.

"High-Performance Liquid Affinity Chromatography with Concanavalin A, Lens culinaris agglutinin and Sambucus nigra agglutinin bounded silica" (En préparation).

GENERALITES /

LE CYCLE CELLULAIRE

La capacité de croître et de se reproduire est une fonction fondamentale dont dépend la survie de toute espèce cellulaire.

Les organismes pluricellulaires se forment à la suite de séquences complexes de divisions, ponctuées périodiquement par la fusion des cellules sexuelles. Un animal ou un végétal supérieur parvenu à maturité voit sa division cellulaire persister. Elle reste, en effet, un moyen de compenser les pertes de substances liées aux dégradations, naturelles ou non, ou aux agressions subies par les tissus. De plus, elle intervient dans le fonctionnement du système immunitaire et dans bien d'autres phénomènes physiologiques. Si sa croissance est perturbée, la cellule meurt ou, inversement, elle se développe anarchiquement et induit un cancer. La multiplication cellulaire est donc un des phénomènes primordiaux de toute forme vivante.

La vitesse des divisions varie suivant les types cellulaires étudiés. Ainsi, chez l'Homme, les précurseurs des hématies dans la moelle osseuse doivent se diviser très rapidement ($2,5 \cdot 10^6$ cellules nouvelles par seconde), alors que les neurones matures ne se divisent naturellement pas, le stock étant établi dès la naissance. D'autres tissus, comme le foie, les reins ou les poumons, possèdent des cellules qui présentent des temps de division intermédiaires. Ces cellules ne sont pas toujours en croissance et peuvent vivre sans se multiplier : elles sont dites quiescentes ou au repos.

Lors de la réversion de cet état de repos, s'accomplit une série d'étapes capitales pour la cellule, en commençant par la croissance de cette dernière, ce qui correspond à une augmentation quantitative et coordonnée des milliers de types moléculaires différents qui participent à la structure ou à la fonction de cette cellule, pour se terminer par la

séparation du cytoplasme et des chromosomes entre deux cellules-filles au cours de la division cellulaire.

Le temps de division des cellules est représenté par "l'horloge mitotique" ou "cycle cellulaire".

Après avoir brièvement rappelé des notions fondamentales caractérisant la division cellulaire, en nous limitant au cycle mitotique, nous effectuerons une courte revue sur quelques méthodes d'obtention de populations cellulaires synchrones.

I. LE CYCLE MITOTIQUE DES CELLULES EUCARYOTES

Les différentes études sur la reproduction cellulaire ont toutes convergé vers une représentation sous forme de cycle au cours duquel alternent croissance et division (Howard et Pelc, 1951). La cellule se développe en suivant un processus continu entre deux divisions cellulaires, durant l'interphase, pour se diviser ensuite et donner deux cellules-filles qui se multiplient à leur tour, la population cellulaire étant ainsi en croissance exponentielle. Celle-ci est exprimée par le temps de doublement qui est défini par le temps nécessaire pour doubler le poids d'un tissu donné.

La répartition des divers composants cellulaires s'effectue de manière empirique : s'il existe beaucoup de copies d'un type particulier d'organite ou de molécule, il suffit que le nombre de copies soit approximativement doublé au cours d'un cycle et que les cellules-filles en reçoivent des parts à peu près égales. Il existe cependant au moins une exception évidente : l'ADN doit toujours être exactement "dupliqué" et réparti précisément entre les deux cellules filles. Ce processus requiert des mécanismes bien particuliers. Aussi, lorsque l'on considère

le cycle cellulaire, il est parfois commode de faire la distinction entre "cycle chromosomique" et "cycle cytoplasmique" qui se déroulent en parallèle. Ces deux phénomènes nécessitent une duplication précise et une transmission fidèle du centrosome pour permettre l'organisation des deux pôles du fuseau mitotique, ce "cycle du centrosome" pouvant être considéré comme une troisième composante du cycle cellulaire (**Robbins et al., 1968**).

Des limites arbitraires ont été fixées pour chaque événement du cycle cellulaire : la période de duplication de l'ADN est la phase S (synthèse) et la phase de ségrégation chromosomique est la phase M (mitose). Ces deux "périodes actives" sont séparées par deux "phases de latence" G_1 et G_2 (Fig. 1, page suivante).

En ce qui concerne les cellules des Mammifères, la durée des périodes S, G_2 et M est relativement constante et s'étend, en moyenne, respectivement sur 8h, 3h et 1h, la phase G_1 variant plus largement (entre 3 et 12h, voire jusqu'à plusieurs jours). Les cellules des tissus adultes présentent généralement une phase G_1 beaucoup plus longue que les cellules en culture alors que, dans les cellules embryonnaires, elle peut ne pas exister, la durée étant indépendante de la taille des cellules (**Fox et Pardee, 1970**). Dans la plupart des cas, la phase G_1 est donc responsable des différences essentielles qui existent dans la durée du cycle cellulaire. Il a toutefois été montré que, à l'intérieur d'une même population, les durées des différentes phases du cycle peuvent être très variables d'une cellule à l'autre (**Collyn-d'Hooghe et al., 1977**).

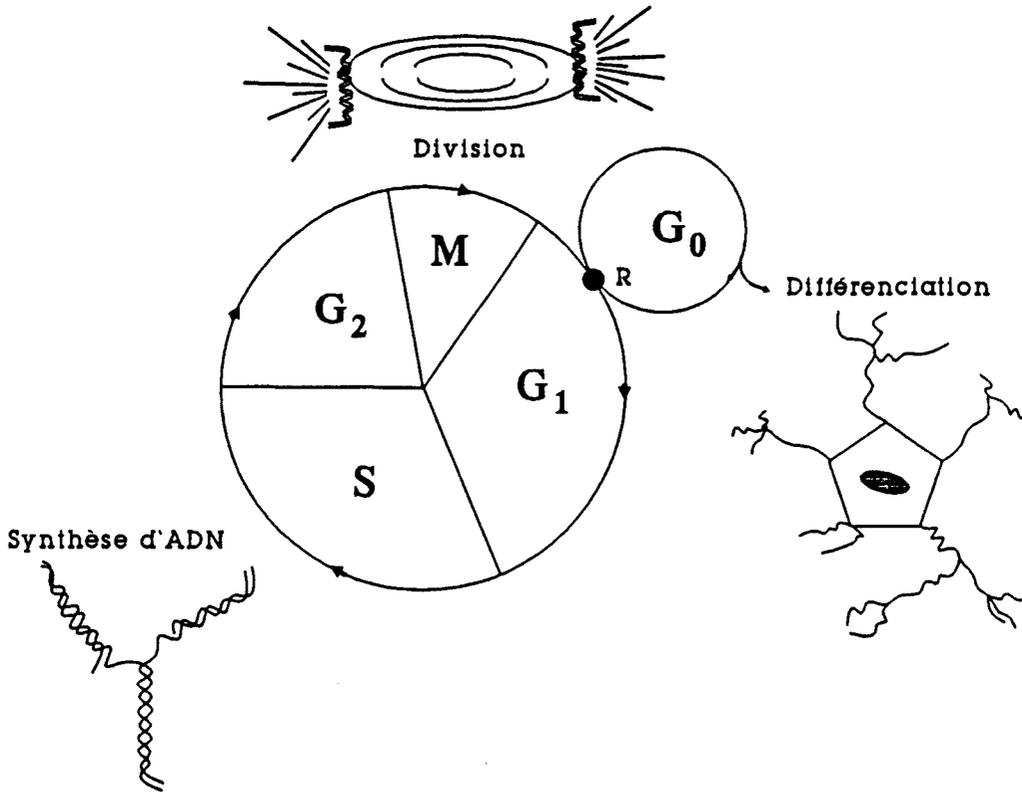


Figure 1 : Représentation schématique des subdivisions du cycle cellulaire eucaryotique. R correspond au point de contrôle où la cellule opte soit pour la croissance active, soit pour l'état de repos. Ce dernier n'existe pas dans le cas des cellules transformées. Celles-ci sont alors caractérisées par une succession de cycles rapides.

L'existence de processus biologiques aussi complexes que le cycle, la différenciation ou la transformation cellulaire (assimilée à un cas de différenciation pathologique) laissent penser que les processus métaboliques les dirigeant sont différents dans chaque cas, ou présentent au minimum un certain nombre de particularités permettant leur caractérisation biochimique, notamment dans le cas de la glycosylation de surface.

I.1. Les phases du cycle mitotique (*).

I.1.1. La phase G_1 .

La phase G_1 est la première étape du cycle. En apparence peu importante, elle est cependant assez complexe et sa progression comprend plusieurs subdivisions (Rossow et al., 1979). Elle est le théâtre de synthèses diverses qui préparent la phase S : début de production d'ADN, d'histones et d'enzymes. De plus, la différenciation cellulaire y est induite.

Cette phase peut ainsi être distinguée de la phase G_0 , phase quiescente (revue de Cross et al., 1989). En effet, lors de la phase G_0 , la taille de la cellule diminue légèrement à la suite de la dégradation de protéines et d'ARN qui se resynthétisent assez lentement, les synthèses macromoléculaires étant en moyenne trois fois plus lentes qu'en phase G_1 . De plus, les activités enzymatiques et les transports membranaires se ralentissent, certains récepteurs membranaires comme celui des transferrines se raréfient (Neckers, 1991) et les ribosomes sont plutôt sous forme monosomale que polysomale.

L'hypothèse d'un point d'initiation ou de restriction (start) dans le cycle cellulaire a été émise (Pardee, 1974), point de restriction où la chaîne des événements de la phase S est déclenchée et où la progression au cours du cycle n'est plus influencée par les facteurs extérieurs. Les cellules ne passent le point d'initiation qu'après avoir atteint une taille critique (Fantes, 1977).

La phase G_1 peut être subdivisée en plusieurs étapes communes à beaucoup de modèles cellulaires (Fig. 2) :

(*) Pour des revues générales sur le sujet, voir Cross et al., 1989 ; Laskey et al., 1989 ; McIntosh et Koonce, 1989 ; Pardee, 1989.

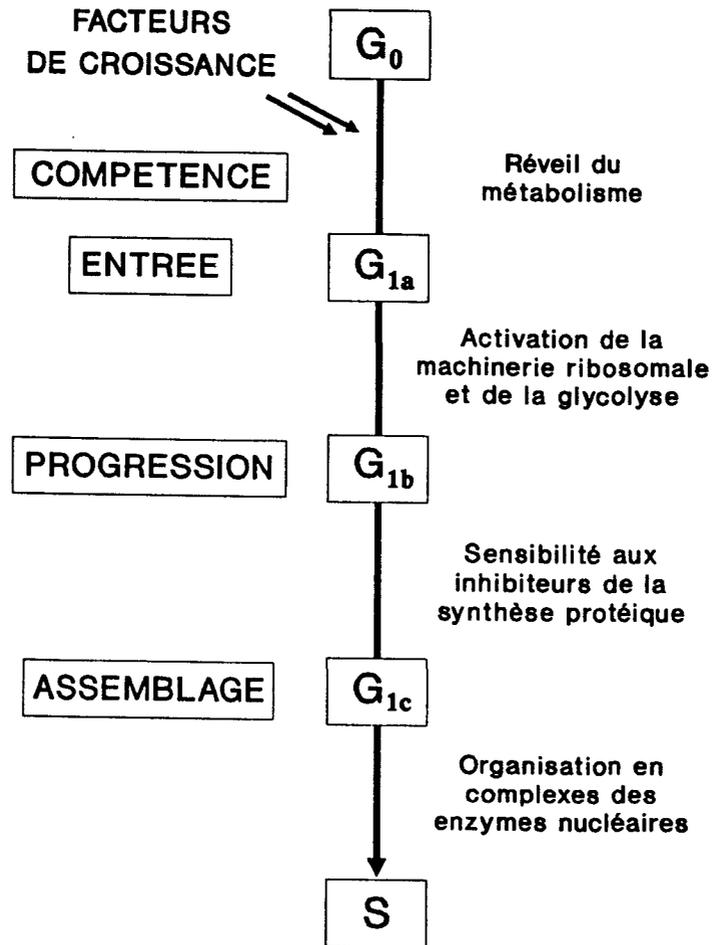


Figure 2 : Subdivisions de la phase G_1 conduisant la cellule d'une phase de latence à une phase active de réplication.

- L'addition aux cellules quiescentes de certains facteurs de croissance (Barnes et Sato, 1980) les fait entrer irréversiblement en phase G_1 ; elles deviennent alors "compétentes" (Rossow et al., 1979). Des changements apparaissent dans la structure de la chromatine, accompagnés d'une augmentation du transport des nutriments à travers la membrane, ainsi que de la production de nouveaux ARNm.

- L'étape suivante, dite "étape d'entrée" ou phase G_{1a} , est à proprement parler le véritable point de départ de la phase G_1 , c'est à dire du cycle lui-même. Elle se caractérise par la synthèse de nouvelles macromolécules ainsi que par l'augmentation du nombre de polysomes et d'enzymes de la glycolyse.

- Suit alors la phase G_{1b} , dite de "progression". Cette période est très sensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique et est marquée par l'importance du contrôle qu'exercent ces protéines (Pardee, 1987). La synthèse protéique est alors nécessairement rapide et la production d'enzymes du métabolisme de l'ADN, annonciatrice de la phase S, débute à ce niveau. La phase G_1 se termine alors par l'étape "d'assemblage" ou phase G_{1c} .

- Cette phase G_{1c} est caractérisée par des mouvements d'enzymes nucléaires ainsi que par leur organisation en complexes pour catalyser la synthèse de l'ADN. A ce niveau, il n'y a pas nécessité de synthèse protéique importante, ni d'addition de sérum dans les cultures.

Durant cette phase G_1 , des signaux extérieurs déclenchant la réplication de l'ADN peuvent parvenir au noyau, apportés généralement par des facteurs de croissance (revue de Cross et al., 1989). Ces signaux possèdent des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule auxquels ils se fixent pour s'activer par autophosphorylation. Une de leur sous-unités est une tyrosine kinase activant une phospholipase C responsable de l'hydrolyse des inositols phospholipides en inositol-1,4,5 triphosphate (InsP3) et en 1,2-diacylglycérol (DG), activateur d'une protéine kinase C (Nishizuka, 1984). L'activation de cette dernière augmente le pH intracellulaire (activation des pompes Na^+/H^+) et stimule

la transcription et la prolifération cellulaire. L'inositol phosphate, quant à lui, active le processus de libération des ions Ca^{++} accumulés dans le réticulum endoplasmique (Berridge et Irvine, 1984) (Fig. 3).

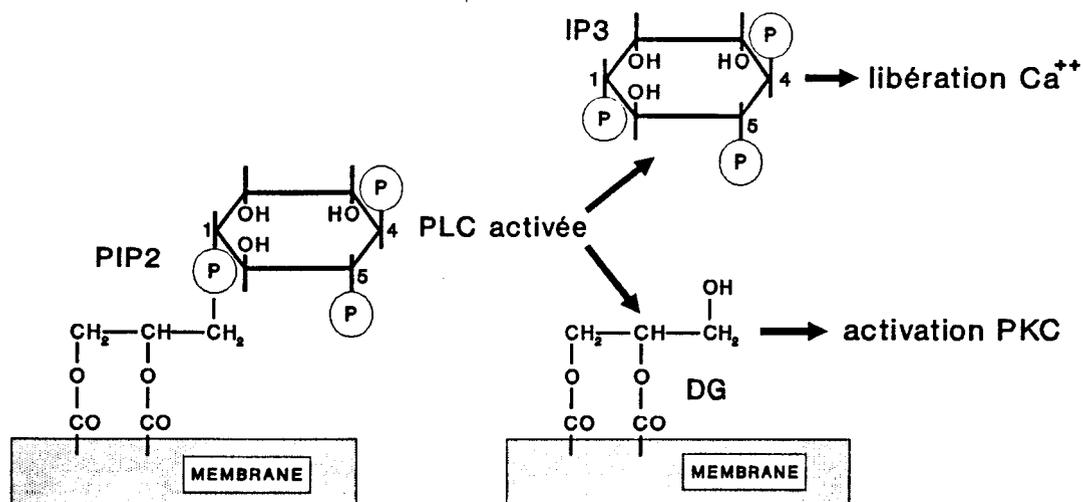


Figure 3 : Hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) par la phospholipase C activée (PLC). L'hydrolyse conduit à la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DG).

La fixation de diverses hormones, de neurotransmetteurs ou de facteurs de croissance sur leurs récepteurs spécifiques à la surface cellulaire se traduit par l'accélération du métabolisme des phospholipides contenant de l'inositol (Berridge et Irvine, 1984). Des perturbations au niveau du système de messagers constitué par les lipoinositols pourraient être responsables de la croissance anarchique des cellules transformées. En effet, la cascade de réactions associée au métabolisme des phosphoinositols comprend des sites d'action de certains oncogènes (Sugimoto et al., 1984 ; Macara et al., 1984).

Toutes ces réactions, illustrées par la figure 4 (page suivante), activent donc un certain nombre de facteurs appelés seconds messagers, comme le diacylglycérol, l'inositol triphosphate, les nucléotides cycliques, les cations Ca^{++} , Na^+ et H^+ , les prostaglandines, des polyamines et des phosphoprotéines qui sont connus pour activer la transcription génique par l'intermédiaire de kinases agissant au niveau des promoteurs. Certaines kinases font intervenir des effecteurs comme l'AMP cyclique (Costa et al., 1976) et la calmoduline, porteuse de Ca^{++} et activatrice de kinases. Il est à noter, à cet égard, que l'AMPc bloque la croissance cellulaire par inhibition de la synthèse d'ADN, tandis que le GMPc la stimule (revue de Pastan et al., 1975). Les cellules sont compétentes et se mettent à produire immédiatement des ARN messagers comme fos et jun, puis myc quelques heures après. La plupart de ces ARN ont une vitesse de renouvellement rapide et leur transcription ne requiert pas la production d'autres protéines.

I.1.2. La phase S.

Il s'agit d'une des deux phases dynamiques du cycle chromosomique au cours de laquelle le matériel nucléique doit se dupliquer de manière rigoureuse en vue d'obtenir deux cellules filles strictement identiques du point de vue génomique. La réplication est bidirectionnelle et se déroule en de multiples loci sur chaque filament de chromatine.

La longueur de cette phase varie suivant les espèces cellulaires et le stade de différenciation de la cellule dans la même espèce. L'embryon de *Drosophile a*, par exemple, une phase S de 4min, durée qui passe à 10h lorsqu'elle est adulte.

L'ADN n'est pas seul à se répliquer. En effet toute l'architecture chromosomique, comme les nucléosomes, se duplique en parallèle, indépendamment de la réplication nucléique. Cet assemblage

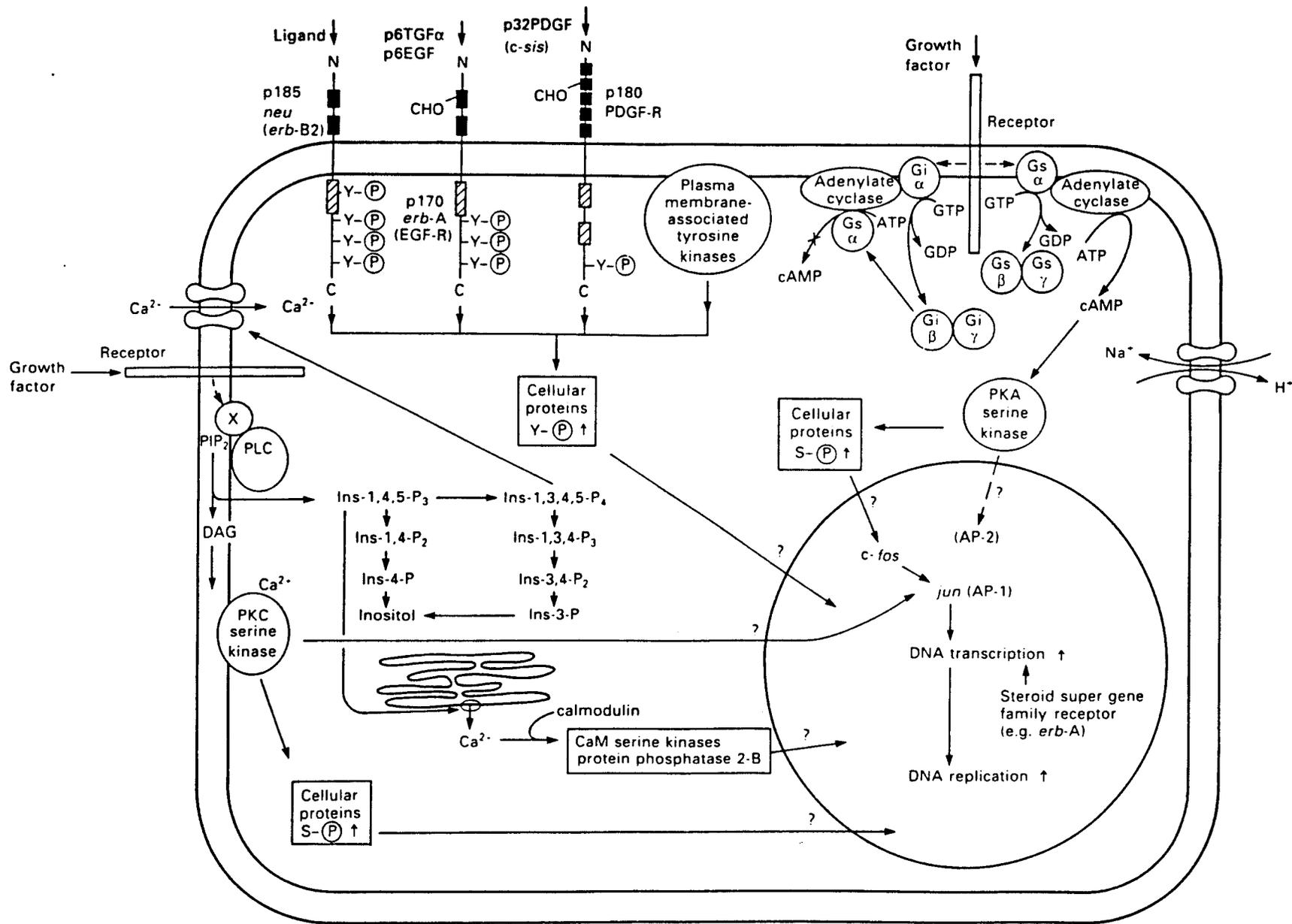


Figure 4 : Principaux modes d'intervention connus des facteurs de croissance dans le déclenchement de la mitose (Rayter et al., 1989).

nucléosomique ne peut s'effectuer qu'à la suite de la synthèse des histones, cette dernière ne s'effectuant qu'en phase S (revue de **Osley, 1991**).

La phase S est induite par des signaux cytoplasmiques sans spécificité d'espèce : les facteurs cytoplasmiques d'une espèce peuvent induire la phase S du noyau d'autres espèces. Des expériences de fusion cellulaire ont montré que les signaux sont présents en début et sont éliminés avant la fin de la phase S. Ainsi, un antigène nucléaire nommé PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) se trouve à un niveau 2 à 3 fois plus élevé en phase S que dans le reste du cycle (**Morris et Mathews, 1989**) et est en relation avec l'induction de la réplication de l'ADN (**Liu et al., 1989**). La réplication ne peut se dérouler qu'une seule fois entre deux mitoses. En effet, la cellule reconnaît l'ADN répliqué et ne laisse son noyau entrer à nouveau en S qu'une fois la mitose achevée.

I.1.3. La phase G_2 .

Cette période fait la liaison entre la fin de la réplication de l'ADN et le début de la mitose. Les événements moléculaires qui interviennent au cours de cette phase sont peu connus et se limitent aux observations suivantes :

- L'inhibition de la synthèse de l'ARN ou de la synthèse protéique bloque l'entrée en G_2 , ce qui signifie que la synthèse de nouvelles molécules d'ARN et de protéines est nécessaire.
- Plusieurs protéines apparaissent au cours de la phase G_2 , puis disparaissent dès que la mitose est terminée.
- Il existerait un inhibiteur de la synthèse d'ADN associé à l'enveloppe nucléaire dont la présence expliquerait que, après fusion, des noyaux

de cellules en G_2 inhibent la réplication, sauf s'ils ont été préalablement lavés.

- Les filaments d'actine se réorganisent pour préparer la division cellulaire et la synthèse de tubuline s'amplifie en fin de S et durant la phase G_2 .

Le blocage du cycle cellulaire en période G_2 survient occasionnellement dans les cellules somatiques des plantes et des animaux. Dans le cas de la peau par exemple, quelques cellules restent à l'état stationnaire en phase G_2 , mais en cas de blessure, la levée du blocage est immédiate et les cellules reprennent leur division.

Cette phase est également caractérisée par une grande sensibilité aux irradiations, ces dernières pouvant entraîner un allongement de la phase G_2 et de la mitose appelé "retard à la mitose" et dépendant de l'intensité de l'irradiation ainsi que de l'âge de la cellule (Collyn-d'Hooghe et al., 1980a et b).

1.1.4. La Mitose (phase M).

La mitose proprement dite rassemble une série d'événements dont le but est, chez les cellules eucaryotes, d'assurer la répartition équitable de leurs chromosomes au cours de la division cellulaire. Les cytologistes ont l'habitude de distinguer quatre phases dont les limites ont nécessairement un caractère arbitraire :

a. **La Prophase**, à elle seule aussi longue que les trois autres phases réunies, se caractérise par la condensation, par une spiralisation plus importante, des chromatides dupliquées à partir d'un état dispersé et métaboliquement actif à un état compacté en vue de leur transport. Parallèlement, les microtubules (revue de **Baskin et Cande, 1990**) et microfilaments du cytosquelette se réarrangent et destabilisent

l'organisation interphasique du cytoplasme, changeant ainsi la forme de la cellule en lui donnant un aspect arrondi.

Les réarrangements microtubulaires sont dûs aux changements du centrosome qui conduit à la formation du fuseau mitotique (revue de **Sluder, 1989**).

La phosphorylation des microtubules augmente au cours de la mitose pour diminuer ensuite en phase G_1 , alors qu'elle est pratiquement constante dans les autres phases comme dans le cas des cellules HeLa (**Piras et Piras, 1975**).

L'appareil de Golgi se disperse en un grand nombre de petites vésicules réparties dans tout le cytoplasme. La synthèse d'ARNm cesse et celle des ARNr ralentit, provoquant la disparition des nucléoles, l'ADN étant trop compacté pour permettre l'action des ARN polymérase. La synthèse protéique tombe à 25% de son niveau normal, les ribosomes devenant inefficaces, l'arrêt de la synthèse des ARNm n'étant pas en cause, ceux-ci ayant une durée de vie plus longue que la mitose.

b. La (Pré)métaphase voit les chromosomes condensés se positionner, par orientation d'une copie de chacun d'eux, de part et d'autre du plan équatorial du fuseau, ainsi que par leur mouvement vers l'équateur de la cellule, pour former le plan métaphasique. Chaque chromosome est maintenu sous tension à ce niveau par les kinétochores appariés et leurs microtubules associés (Métaphase).

Le départ de ce processus est défini par les interactions entre les chromosomes et les fibres du fuseau par l'intermédiaire des centromères.

Chez les Eucaryotes supérieurs, l'enveloppe nucléaire se lyse pour permettre ces interactions, mais chez certains Champignons et Algues, le fuseau peut se former dans le noyau, celui-ci ayant conservé son enveloppe.

c. **L'Anaphase**, déclenchée par une augmentation de la concentration cytosolique en ions calcium, est marquée par la séparation de chaque chromosome en deux parties identiques, suivie par leur mouvement vers les pôles opposés de la cellule, mouvement qui s'effectue sous le commandement des centromères.

Deux événements distincts ont pu être discernés : l'anaphase A (séparation des chromosomes), apparemment indépendante de l'ATP exogène, et l'anaphase B (allongement du fuseau) qui est ATP et Mg^{++} -dépendante.

L'anaphase A concerne la migration des chromatides-soeurs vers les pôles du fuseau à la suite de la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens.

L'anaphase B, par contre, est caractérisée par l'allongement de l'ossature interpolaire.

En fin d'anaphase se forment deux masses près des pôles autour desquelles se reforment les enveloppes nucléaires, suite à la déphosphorylation des lamines. D'un point de vue génétique, ce sont deux lots identiques de chromosomes qui se retrouvent à chacun des pôles du fuseau.

d. **La Télophase** concerne la formation des noyaux-fils et la décondensation des chromosomes pour rétablir les conditions interphasiques. Des vésicules membranaires issues du reticulum endoplasmique s'associent aux lamines à la surface de chaque chromosome et fusionnent pour entourer partiellement des groupes de chromosomes avant de reconstituer l'enveloppe nucléaire complète et former deux noyaux interphasiques.

Chez les animaux, les protozoaires et les plantes unicellulaires, la division nucléaire est suivie par une division cellulaire (cytodiérèse),

régie par un anneau contractile actomyosine-dépendant qui divise empiriquement le cytoplasme en deux parts égales contenant chacune la moitié des constituants cytoplasmiques.

La concentration en la plupart des composants membranaires (protéines, phospholipides, cholestérol et glucides) doit être approximativement doublée pour permettre la division. Cependant, cette surface cellulaire n'est pas obligatoirement doublée avant la division (revue de **Pasternak, 1976**).

Chez les végétaux supérieurs, la cytodiérèse résulte de l'action du phragmoplaste au niveau du plan équatorial. Cette structure contient deux jeux de microtubules orientés tête-bêche et organisés en deux rangées parallèles.

I.2. La régulation du cycle cellulaire.

La densité de la population cellulaire à partir de laquelle la prolifération cellulaire en monocouche confluente cesse, par inhibition de contact, s'élève lorsque la concentration en facteurs de croissance augmente dans le milieu. Les cellules voisines sont en compétition pour les quantités infimes de facteurs de croissance disponibles, facteurs qu'elles internalisent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Ce type de compétition pourrait être aussi important pour les cellules d'un tissu que pour les cellules en culture, empêchant leur prolifération au-delà d'une certaine densité de population.

Parmi les facteurs de contrôle du cycle cellulaire, le plus important est le MPF (Maturation Promoting Factor) et, plus particulièrement, ses sous-unités : les cyclines et la protéine p34^{cdc2}.

I.2.1. Le MPF (Maturation Promoting Factor).

Des ovocytes de Xénope, bloqués dans un état dont la meilleure description correspond à la phase G_2 , ont été utilisés pour mettre en évidence l'existence d'un oscillateur cytoplasmique qui alterne entre l'induction de la mitose et l'induction de l'interphase. En effet, des micro-injections de cytoplasme effectuées dans ces cellules les font entrer en méiose : un composant cytoplasmique appelé "Maturation Promoting Factor" ou MPF (Masui et Markert, 1971) a donc induit une activité mitogène. Lors de la méiose I, l'activité MPF augmente et devient supérieure à celle injectée pour disparaître ensuite et ne réapparaître à un haut niveau qu'en cours de métaphase II ; cette activité est donc associée à la métaphase (Wasserman et Masui, 1975).

Le MPF peut induire la méiose I en dehors de toute synthèse protéique et est donc un inducteur immédiat de la méiose. Toutefois, en cas de blocage de la synthèse protéique, les cellules sont stoppées ultérieurement en phase G_2 et, par injection de MPF, tous les événements mitotiques sont restaurés (Miake-Lye et al., 1983). La synthèse protéique est donc nécessaire à la synthèse du MPF lui-même et/ou d'activateurs de ce même MPF qui est le principal régulateur de la division cellulaire, et ceci dans une grande variété de cellules en mitose ou en méiose et non en interphase (Wasserman et Smith, 1978 ; Sunkara et al., 1979 ; Nelkin et al., 1980 ; Weintraub et al., 1982 ; Tachibana et al., 1987). Le noyau y est sensible en n'importe quelle phase du cycle.

Le MPF augmente en début de mitose et son taux chute en fin de métaphase. Il est très conservé au cours de l'évolution et son système d'activation-inactivation régule le cycle mitotique de tous les organismes eucaryotes.

Ce composé est une protéine kinase très affine pour l'histone H1 qu'elle peut substituer six fois par un résidu phosphate (Labbe et al., 1988 ; Lohka et al., 1988).

Le MPF induit une cascade de réactions de phosphorylation de protéines qui conduit à divers événements indépendants, comme la destruction de l'enveloppe nucléaire, l'assemblage du fuseau et la condensation des chromosomes. En parallèle, il y a activation d'une "MPF inactivase" qui inactive le MPF en fin de métaphase et permet la progression du cycle cellulaire jusqu'à l'interphase suivante (Murray, 1987).

L'apparition et la disparition de l'activité MPF au cours du cycle cellulaire normal dépendent d'une modification de la protéine par un processus de phosphorylation-déphosphorylation plutôt que d'une synthèse et d'une dégradation.

I.2.2. Les cyclines.

La synthèse protéique est nécessaire durant l'interphase de chaque cycle cellulaire embryonnaire pour permettre l'entrée en mitose. Ceci sous-entend qu'un composé, indispensable à l'activation du MPF, doit être synthétisé de novo lors de chaque cycle.

Parmi les protéines présentant ces caractéristiques, l'une d'elle s'accumule à l'interphase pour disparaître en mitose. Elle se retrouve chez tous les eucaryotes et est appelée "cycline" (Evans et al., 1983 ; Almendral et al., 1987). Deux classes (cyclines A et B) se retrouvent simultanément dans un bon nombre d'organismes.

Les premiers travaux montrant une implication directe des cyclines dans la transition des phases G_2 -M furent effectués par Swenson et al. (1986) qui montrèrent que l'injection de ARNm de cycline A de mollusque à des oocytes de Xénope (stade VI) provoquait leur

maturation en oeufs. Les mêmes résultats sont obtenus avec des ARNm de cycline B d'oursins (Pines et Hunt, 1987). En effet, des cellules dont les ARNm endogènes, et plus spécifiquement ceux de la cycline B, (Minshull et al., 1989) ont été détruits, se bloquent en interphase (G_2) et l'addition d'ARNm de cycline entraîne la reprise du cycle cellulaire (Murray et Kirschner, 1989).

La longueur de l'interphase ou du cycle diminue si le taux de cycline augmente et l'interphase peut correspondre au temps mis pour obtenir l'accumulation de cycline nécessaire à la division (Murray et Kirschner, 1989).

Des relations évidentes entre les cyclines et le MPF ont rapidement été établies (Draetta et al., 1989) et l'augmentation du taux de MPF lors de la phase M pourrait être provoquée par l'augmentation de concentration de la cycline au dessus d'un certain seuil.

Durant l'interphase, il y a production d'ARNm et accumulation de cycline à un seuil où l'activation du MPF par la cycline est supérieure à son inactivation enzymatique (le taux d'inactivase serait constant durant le cycle).

L'activation du MPF entraîne l'activation du processus de dégradation de la cycline, la dégradation de la cycline B étant nécessaire à l'achèvement de la mitose (Whitfield et al., 1990). La disparition de cette même cycline provoque la destabilisation du MPF par l'inactivase dont l'activité est devenue dominante. Les phosphatases inversent alors l'action des phosphorylases et la cellule se retrouve dans les conditions interphasiques.

Le taux en cycline A n'est pas constant lors de l'embryogenèse, il est même nul dans les oeufs non fertilisés (Whitfield et al., 1990). Lors de chaque cycle cellulaire, la cycline s'accumule durant l'interphase et est détruite en fin de mitose, montrant que sa synthèse, en l'absence

de celle d'autres protéines, est suffisante pour induire l'entrée en mitose (Murray et Kirschner, 1989).

Le système de contrôle de l'activité du MPF par les cyclines et par la MPF inactivase est schématisé par la figure 5.

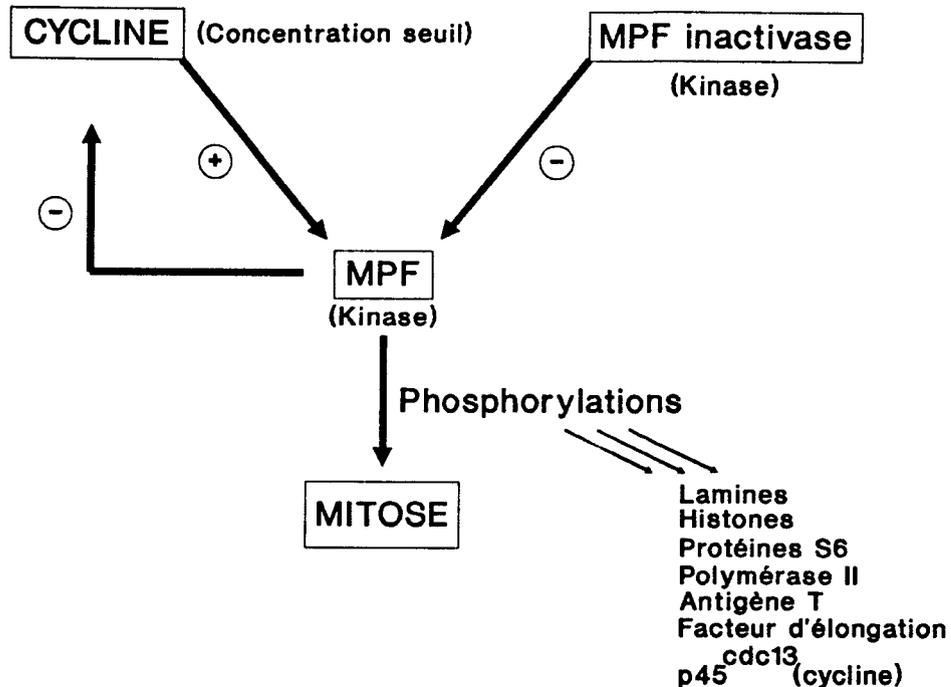


Figure 5 : Mécanisme général de la régulation du MPF par les cyclines et une MPF inactivase.

L'activité de phosphorylation de la cycline dans les cellules somatiques est régie par des rétro-contrôles spécifiques : ainsi la cycline n'est pas activée tant que n'est pas effectuée la synthèse complète de l'ADN. Autrement dit, les cellules ne peuvent entrer en mitose avant que l'ADN ne soit répliqué. D'autres contrôles agissent sur l'accumulation, l'activation et la destruction de cyclines.

I.2.3. La protéine p34^{cdc2}.

Une cinquantaine de gènes intervenant dans la régulation du cycle ont été trouvés ainsi que les interactions les liant. Certains de ces gènes sont nécessaires à l'initiation de la réplication de l'ADN, certains au déroulement normal de la phase S, d'autres interviennent en différents points de la mitose et d'autres encore sont essentiels à la cytotinèse.

L'un d'eux, le cdc2, est le seul dont l'existence soit nécessaire aux deux points de contrôle du cycle cellulaire chez la Levure, en G₁ tardif et en G₂ (Nurse et al., 1976 ; Nurse et Thuriaux, 1980).

Le composé clé du déclenchement mitotique universel est donc une protéine kinase, la p34^{cdc2} chez les Mammifères, protéine de 34kDa qui a été identifiée à une sous-unité du MPF (Arion et al., 1988 ; Dunphy et al., 1988 ; Gautier et al., 1988 ; Labbe et al., 1988) et qui est analogue au produit du gène cdc28 des levures (Reid et Hartwell, 1977 ; Nurse et Bissett, 1981 ; Beach et al., 1982). Cette protéine est en concentration constante durant le cycle et présente de nombreuses homologies avec d'autres kinases (Hindley et Phear, 1984).

Certaines protéines régulatrices contraignent l'activité kinasique à une impulsion convenablement rythmée, ce qui déclenche les événements mitotiques. Ainsi, le gène cdc13 (Booher et Beach, 1988) interagit avec le cdc2 pour induire la mitose (Booher et al., 1989) ; son produit est un homologue de cycline (Booher et Beach, 1988 ; Hagan et al., 1988 ; Solomon et al., 1988).

Un taux élevé de cycline A cause une hyperactivation de la kinase cdc2 et un arrêt du cycle en métaphase (Roy et al., 1991).

La p34^{cdc2} interagit avec une cycline-like au point de contrôle pour induire une activité protéine kinasique qui mène au déclenchement

de la réplication de l'ADN. Lors de la transition G_2/M , la $p34^{cdc2}$ phosphoryle une partie des substrats dont les modifications induisent la mitose. Ces substrats sont nombreux et variés, allant des protéines microtubulaires, nucléaires et nucléolaires à divers produits d'oncogènes en passant par des enzymes comme la caséine kinase II, des facteurs d'élongation de la traduction et des constituants du système contractile, cette liste ne faisant que s'allonger (revue de **Cavadore et al., 1990**).

L'activité MPF serait donc induite par un complexe formé entre une cycline et la $p34^{cdc2}$ (**Draetta et Beach, 1988**), et plus particulièrement entre la cycline B et la $p34^{cdc2}$ (**Labbé et al., 1989 ; Meijer et al., 1989**).

Le niveau de $p34^{cdc2}$ est constant durant le cycle cellulaire (**Simanis et Nurse, 1986 ; Draetta et Beach, 1988**) et le taux de cycline augmente progressivement en interphase.

Pour expliquer l'activation du MPF, on invoque une déphosphorylation de la $p34^{cdc2}$ (**Gautier et al., 1989 ; Labbe et al., 1989a**) et une phosphorylation de la cycline (**Draetta et Beach, 1988 ; Meijer et al., 1989 ; Neant et al., 1989**) (Fig. 6).

La phosphorylation de la $p34$ et la synthèse de cycline peuvent dépendre de la régulation calcique (revue de **Whitaker et Patel, 1990**), régie par les seconds messagers que sont les phospho-inositols.

L'activité de phosphorylation de la $p34^{cdc2}$, en hausse dès l'entrée en mitose, et la dégradation de la cycline accélérée par le MPF lui-même, mènent à l'inactivation du MPF et au retour à l'interphase (**Murray et Kirschner, 1989 ; Murray et al., 1989**).

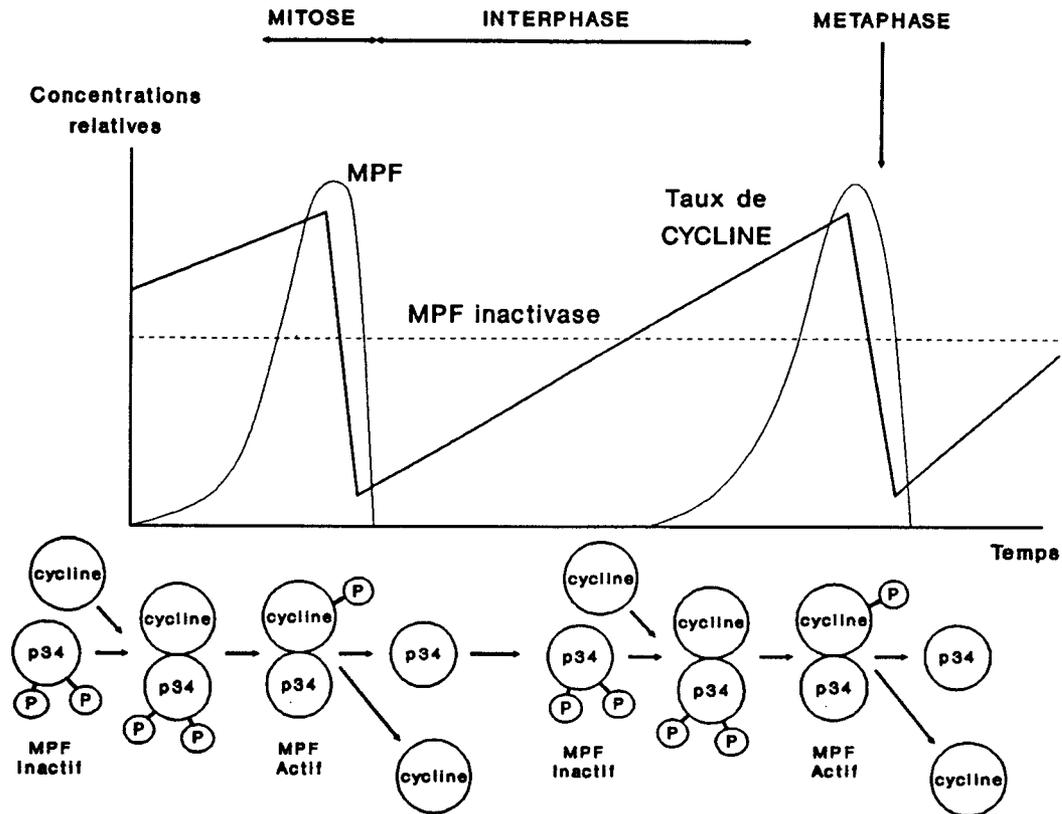


Figure 6 : Régulation du taux de MPF et de cycline au cours du cycle cellulaire. La $p34^{cdc2}$ est associée à une cycline pour former l'activité MPF. La $p34^{cdc2}$ est déphosphorylée et la cycline phosphorylée dans la forme active de l'activité kinase.

En conclusion, les mécanismes de régulation de la division mitotique impliquant le MPF, les cyclines et la protéine $p34^{cdc2}$ sont illustrés par la figure 7 (page suivante).

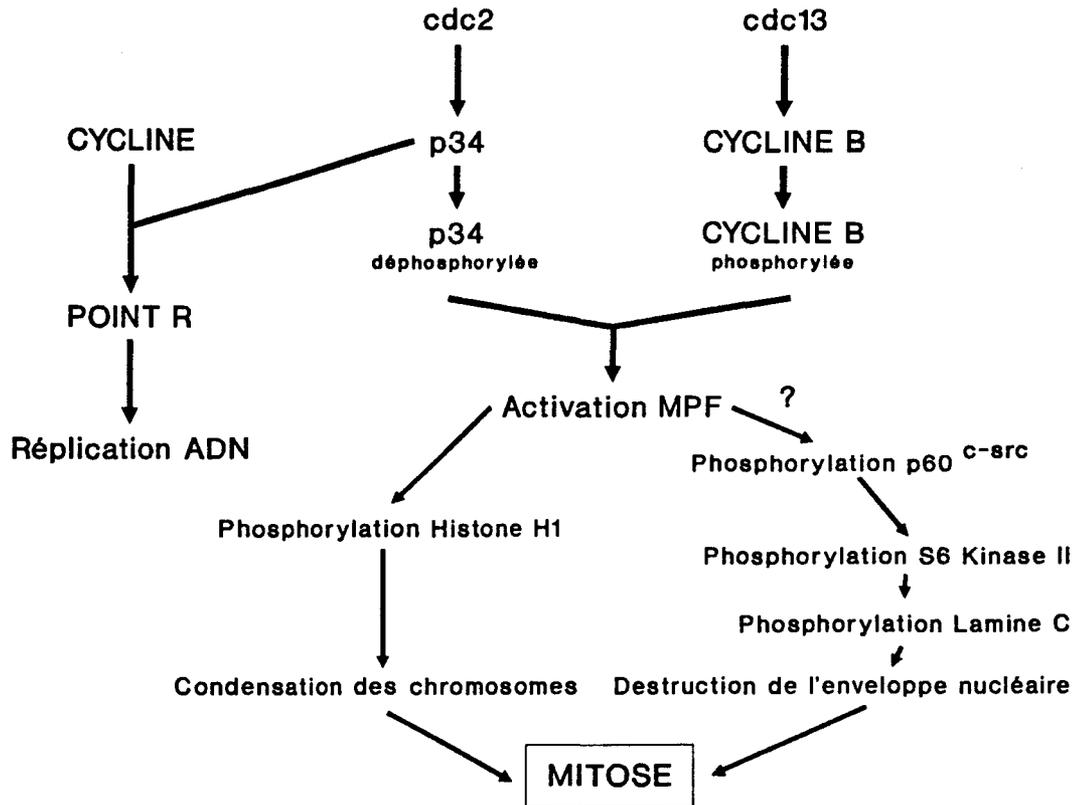


Figure 7 : Des cyclines différentes interviennent dans le déclenchement de la réplication de l'ADN et de la mitose en s'associant avec $p34^{cdc2}$.

1.3. La transformation cellulaire.

Lorsqu'une cellule subit une mutation ou une série de mutations perturbant les contraintes sociales de la division, elle se multiplie indépendamment des besoins de l'organisme entier et sa descendance se manifesterait sous la forme d'une tumeur. La cellule échappe alors aux multiples contrôles de la division cellulaire et accumule ensuite d'autres modifications pour acquérir la capacité d'invasion et de formation de métastases.

Quelques changements ont pu être observés après transformation d'une cellule normale par un virus tumorigène. Il s'agit :

- d'anomalies de la membrane plasmique, comme l'augmentation du transport de métabolites, une mobilité accrue des protéines membranaires ainsi que l'apparition excessive de boursoflures à la surface de cette dernière,

- d'anomalies de l'adhérence, comme la diminution de l'adhérence aux surfaces. Il s'ensuit, d'une part, une capacité de conserver une morphologie arrondie au lieu d'une morphologie étalée, les fibres d'actine ne pouvant plus s'organiser en fibres toniques en raison d'une réduction de l'enveloppe externe de fibronectine et, d'autre part, une forte production d'activateur du plasminogène qui provoque une protéolyse extracellulaire accrue,

- d'anomalies de la croissance et de la division : croissance jusqu'à une densité cellulaire anormalement élevée, diminution des besoins en facteurs de croissance, diminution de la "dépendance d'ancrage" (Liotta, 1986) (les cellules normales doivent adhérer au substratum pour sortir de l'état G_0 et proliférer), "immortalité" et possibilité de provoquer des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des animaux sensibles.

Ces perturbations sont orchestrées par divers gènes appelés oncogènes que la cellule normale possède sous forme de proto-oncogènes (voir les revues de Stéhelin, 1988 ; Studzinski, 1989 ; Carbone et Levine, 1990). Ce sont des gènes normaux du contrôle de la prolifération dont certains codent des facteurs de croissance ou leurs récepteurs (Doolittle et al., 1983) (tyrosines kinases dans la plupart des cas), des médiateurs intracellulaires impliqués dans le signal de division cellulaire (Almendral et al., 1988) et même des facteurs de transcription (Chiu et al., 1988) (Fig. 8, page suivante). Ces proto-

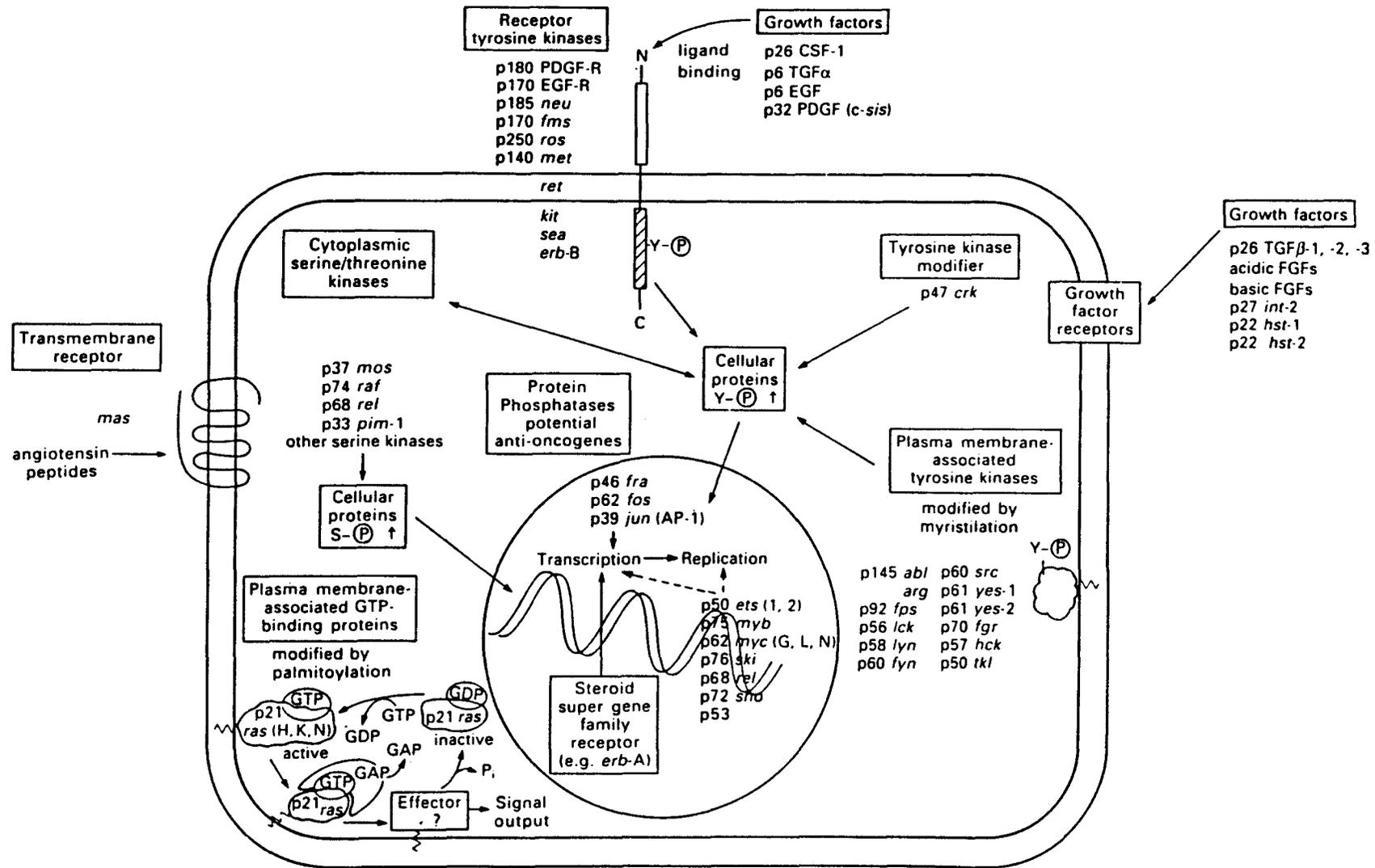


Figure 8 : Similitudes d'action entre les oncogènes et différents facteurs de croissance (Rayter et al., 1989).

oncogènes peuvent être surexprimés ou altérés (**Barbacid, 1987 ; Weinstein, 1987 ; Hatakeyama et Taniguchi, 1988**).

II. SYNCHRONISATION DES CELLULES EUCARYOTES

L'étude des différents événements caractérisant le cycle cellulaire, tant au point de vue moléculaire qu'au point de vue physiologique, nécessite des populations cellulaires synchrones (revue de **Bhuyan et Grophi, 1989**).

Un système de synchronisme naturel existe chez certaines moisissures qui forment des plasmodes, grandes masses cytoplasmiques renfermant plusieurs noyaux et passant par les différentes phases du cycle cellulaire de façon parfaitement synchrone. Ce système a été très utilisé pour étudier le déroulement du cycle nucléaire.

Dans d'autres systèmes, les cycles cellulaires d'une population de cellules sont naturellement synchrones aux premiers stades, comme dans le cas de la division des cellules-oeufs qui ont été fécondées simultanément.

Cependant, dans la plupart des cas, les populations cellulaires sont asynchrones et la mise au point d'un certain nombre de méthodes de synchronisation a été nécessaire. Toutes ne peuvent empêcher les cellules de reprendre rapidement un rythme de croissance indépendant et donc de perdre plus ou moins vite leur synchronisme dès les phases ou cycles suivants.

L'utilisation d'éléments inhibiteurs (Tableau I, page suivante) ou l'appauvrissement du milieu en un élément essentiel permet de synchroniser une population cellulaire à un moment précis du cycle.

Il s'agit de méthodes efficaces et d'application relativement aisée, mais qui présentent toutefois le défaut de perturber le métabolisme cellulaire (revue de **Bhuyan et Grophi, 1989**). En effet, les agents bloquants utilisés sont souvent des poisons métaboliques et leurs effets secondaires sur les cellules sont en général peu connus. Il est donc souhaitable de comparer des lots de cellules bloquées chimiquement à d'autres lots synchronisés par une méthode moins perturbatrice.

Dans le cas des cellules en culture, deux approches sont envisageables : la **synchronisation chimique** par interférence sur le métabolisme ou la **sélection mécanique** qui n'est possible que dans des cas limités. Un blocage doit être réversible afin de permettre la remise en culture des cellules.

Les meilleures méthodes de synchronisation sont celles qui créent des populations de cellules dont les cycles sont synchronisés au niveau de la transition G_1/S ou durant la mitose. L'efficacité de ces méthodes est toutefois amoindrie par la disparition rapide du synchronisme dès les cycles cellulaires suivants. Cette désynchronisation apparaît en raison des différentes vitesses auxquelles les cellules progressent individuellement dans le cycle cellulaire. La durée du temps de génération n'est pas un caractère génétiquement transmis, mais est soumise aux différences de comportement individuel des cellules d'un cycle cellulaire à l'autre. Il s'avère donc nécessaire de mettre au point des méthodes de synchronisation différentes pour obtenir des populations cellulaires enrichies en chacune des phases du cycle.

TABLEAU I : Principaux agents bloquants du cycle cellulaire et utilisés pour synchroniser des cellules.

Agents bloquants	Action inhibitrice	Phase	Références
Lovablastine (réversible)	3-OH-3-méthylglutaryl-CoA réductase	G ₁	Keyomarsi et al., 1991
Myxothiazol (réversible)	Chaînes respiratoires	G _{1b}	Conradt et al., 1989
Acide butyrique		G ₁	Gorisse et al., 1990
Mimosine (réversible)	Synthèse de l'hypusine	G ₁ /S	Watson et al., 1991
Hydroxyurée	Réduction des ribo- en désoxyribonucléotides	G ₁ /S	Young et al., 1967
Forskoline	Par augmentation du taux de cAMP	G ₁ , (G ₂)	Blomhoff et al., 1988
Aphidicoline (réversible) double blocage	DNA polymérase α (analogue dCTP)	Début S	Ikegami et al., 1978 Huberman et al., 1981 Watson et al., 1991 Matherly et al., 1989
Cycloheximide	Synthèse protéique	S	Mc Keehan et Hardesty, 1969 Rajalakshmi et al., 1971 Hatakeyama et Suzuki, 1990
Phléomycine (léthal)		G ₂	Djordjevic et Kin, 1967
Hoechst 33342(réversible)	DNA topoisomérase II	G ₂	Tobey et al., 1990
Nitrosourée(irréversible)	Synthèse protéique	G ₂	Al-Bader et al., 1978
Dibutyryl cAMP		G ₂	Stam Brook et Velez, 1976
Colcémide	Poison du fuseau	M	Stubblefield & Klevecz, 1965 Bhuyan 1977 et 1987
Colchicine (léthal)	Poison du fuseau	M	Bruchowsky et al., 1965 Piras et Piras, 1975
Vinblastine sulfat		Métaphase	Djordjevic et Kin, 1967 Madoc-Jones et Mauro, 1968
Vincristine		M	Madoc-Jones et Mauro, 1968

Les cellules bloquées en phase G_1 ou G_2 peuvent rester en phase de latence et survivre des semaines, des mois ou même des années. Par contre, les cellules que l'on bloque expérimentalement dans la phase S par des agents toxiques meurent en quelques heures.

II.1. Enrichissement d'une population cellulaire en phase G_1/G_0 .

Une méthode assez simple peut être utilisée pour obtenir des fractions de cellules enrichies en G_1/G_0 . Cette technique consiste à laisser les cellules atteindre la phase stationnaire de croissance ou plateau tardif. Par manque d'espace et par inhibition de contact et/ou par privation d'éléments comme les facteurs de croissance ou encore par appauvrissement du milieu en sérum, les cellules vont s'accumuler en phase G_1/G_0 (Wharton et al., 1981 ; Campisi et al., 1984 ; Larsson, 1988). Une technique couramment utilisée consiste à priver la cellule d'un nutriment indispensable à sa croissance, comme l'isoleucine, et à provoquer ainsi un enrichissement de la population en cellules G_0/G_1 (Ley et Tobey, 1970 ; Tobey, 1973).

II.2. Enrichissement d'une population cellulaire en phase S.

Il peut être obtenu de deux manières :

1°) Par blocage de la synthèse de l'acide thymidylrique.

Une technique à moindre risque consiste à bloquer la synthèse de l'ADN et donc à accumuler les cellules en phase S, grâce à des analogues de la thymidine, comme la fluorodésoxyuridine qui inhibe la TMP (thymidine monophosphate) synthétase. Dans le but de bloquer la réplication de l'ADN et de stopper la reproduction cellulaire, la synthèse de TMP, indispensable à la synthèse d'ADN, peut être arrêtée

au niveau de différentes étapes réactionnelles. Ainsi, la fluorodésoxyuridine empêche les cellules en fin de phase G_1 d'atteindre la phase S et entraîne la mort des cellules qui avaient déjà atteint cette phase (Rueckert et Mueller, 1960 ; Till et al., 1963). En ajoutant de la thymidine dans le milieu de culture, la synthèse de TTP peut reprendre assurant ainsi de nouveau la réplication des ADN. En prélevant les cellules à des temps précis après la levée du blocage, elles peuvent être étudiées à différentes périodes de la phase S.

2°) Par blocage de l'activité nucléoside diphosphate réductase.

a- Par de l'**hydroxyurée** (Fig. 9), un inhibiteur de la nucléoside diphosphatase réductase, catalyseur de la synthèse de déoxyUDP (dUDP) à partir d'UDP et de dCDP à partir de CDP (Young et al., 1967). L'efficacité de ce composé est augmentée par l'utilisation d'une méthode "séquencée" en présynchronisant les cellules par privation d'isoleucine, avant d'introduire l'hydroxyurée (Hamlin et Pardee, 1976).

b- Par la **thymidine** elle-même (Fig. 9) qui peut être utilisée pour synchroniser les cellules à l'interface G_1/S (Xeros, 1962). En excès dans le milieu de culture, elle pénètre très rapidement dans les cellules où elle est phosphorylée en TTP. Lorsque sa concentration intracellulaire augmente, la nucléoside diphosphate réductase (enzyme allostérique) est inhibée, ce qui empêche la synthèse, non seulement de TTP, mais aussi de dCTP (Morris et Fisher, 1963 ; Morris et al., 1963).

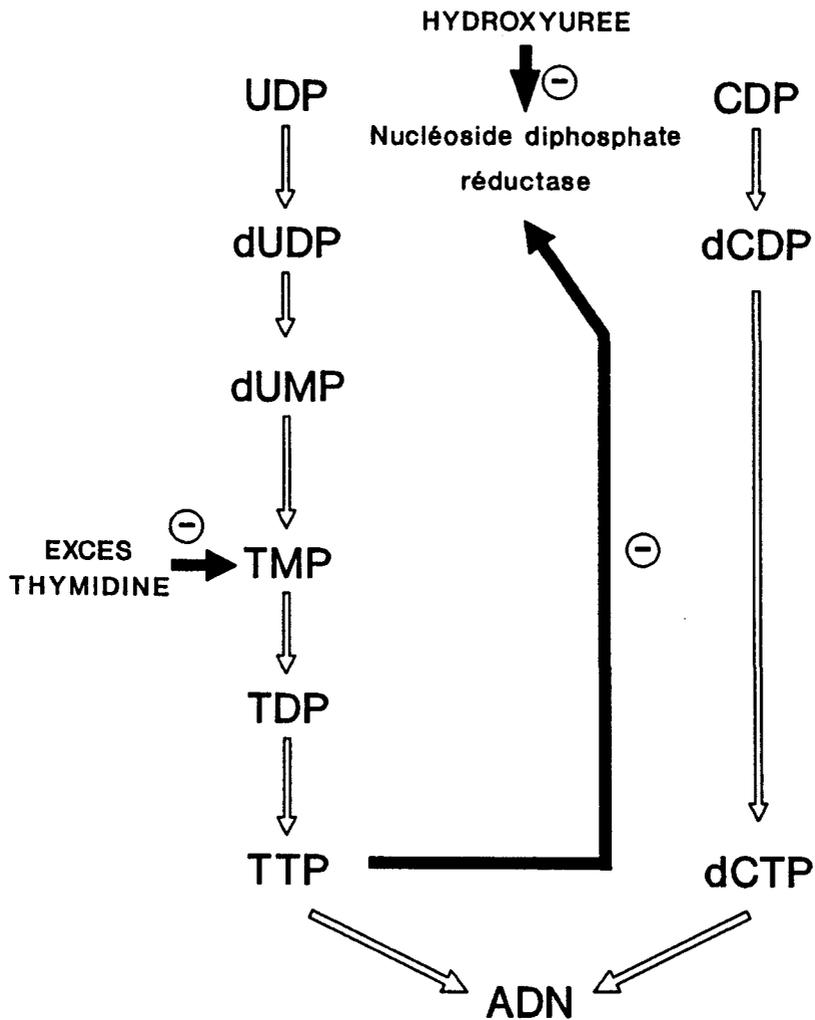


Figure 9 : Un excès de thymidine bloque la synthèse de l'ADN par rétro-inhibition de la nucléoside diphosphate réductase (enzyme allostérique). L'hydroxyurée inhibe également l'action de cette enzyme.

La réplication de l'ADN est alors impossible, même si des cellules en fin de G_1 peuvent entrer en phase S, un peu de dCTP continuant à être produit. La réplication est cependant extrêmement lente et les cellules s'accumulent dans la première partie de la phase S. Les cellules qui étaient déjà en phase S quand la concentration de thymidine a augmenté poursuivent la réplication de leur ADN à une vitesse très lente. Les cellules qui étaient en phase G_2 , M ou G_1 ne sont pas

affectées dans la vitesse du déroulement de leur cycle cellulaire jusqu'à ce qu'elles parviennent en phase S. Si les cellules sont en présence d'un excès de thymidine durant une période équivalente à la somme des durées des phases G_2 , M et G_1 , alors toutes les cellules de ces phases atteignent l'interface G_1/S et y restent bloquées (Fig. 10). Les cellules en phase S ne la quittent pas et progressent très lentement. Lorsque la concentration en thymidine retrouve la normale, l'incubation des cellules pendant un temps égal à la durée de la phase S permet aux cellules de terminer leur répllication. Les cellules qui étaient initialement réparties en différents points de la phase S seront alors en différents points des phases G_2 , M et G_1 . Une importante proportion de cellules bloquées au début de la phase S sera alors en phase G_2 . Ainsi, toutes les cellules de la culture seront en phase G_2 , M ou G_1 . Ces cellules se retrouveront donc bloquées en phase S.

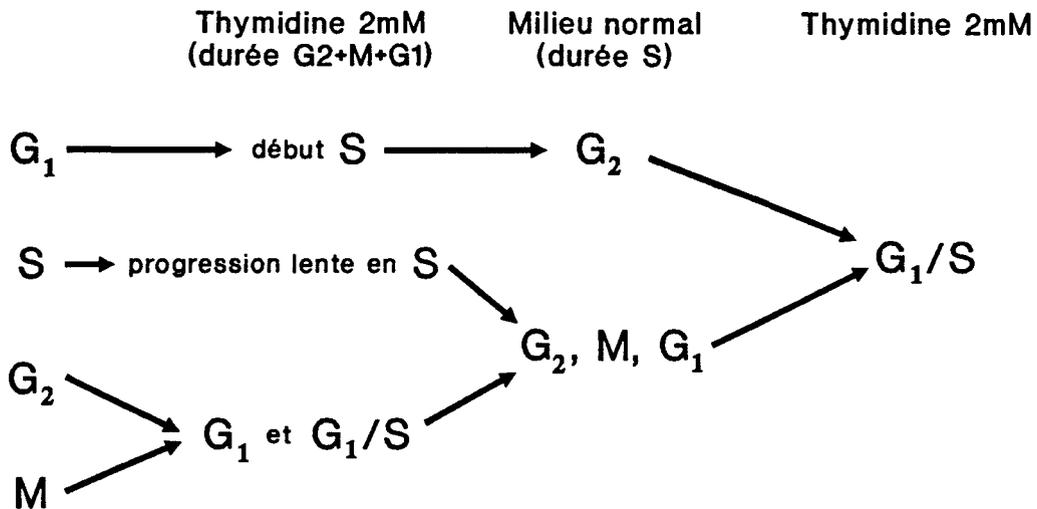


Figure 10 : Principe du double blocage du cycle mitotique par la thymidine. Un premier blocage accumule la plupart des cellules en phase G_1 ou S. Une remise en culture suivie d'un nouveau blocage aboutit à un enrichissement de la population en cellules à l'interface G_1/S .

Cette méthode de synchronisation est appelée "double blocage par la thymidine" et permet d'obtenir expérimentalement un degré élevé de synchronisation des cycles cellulaires grâce à l'utilisation d'un mécanisme normal de régulation métabolique en remplacement des agents chimiques et toutes les incertitudes d'analyse les accompagnant. Des études ont cependant montré que le blocage ne concernait que la synthèse de l'ADN, celle d'ARN ou de protéines continuant : le noyau serait donc en phase S et le cytoplasme aurait un phénotype G_2 (Studzinski et Lambert, 1969).

II.3. Enrichissement d'une population cellulaire en phase G_2 .

Pour synchroniser en phase G_2 , il n'existe pas véritablement de méthode spécifique et la technique la plus courante utilise une présynchronisation en G_1/S suivie d'une remise en culture jusqu'à l'obtention d'une accumulation de cellules en phases S/G_2 (Al-Bader et al., 1978).

L'utilisation de bisbenzimidazole (Hoechst 33342), précédée d'une présynchronisation en G_1/S , peut bloquer réversiblement la DNA topoisomérase II et accumuler les cellules en phase G_2 , sans toxicité apparente (Tobey et al., 1990).

II.4. Enrichissement d'une population cellulaire en cellules en phase M.

Une première méthode est fondée sur le tri mécanique des cellules "mitotiques" cultivées en monocouches. Ces cellules prennent généralement une forme plate en se fixant sur leur support de culture. Lors de la mitose, les bouleversements microtubulaires (dissociation du cytosquelette et constitution du fuseau mitotique) donnent une forme sphérique aux cellules qui perdent une grande partie de leurs points

d'attache sur la matrice. L'agitation des boîtes de culture permet leur mise en suspension préférentielle et de les isoler par centrifugation (**Terasima et Tolmach, 1962 et 1963**). Une fraction cellulaire synchrone peut ainsi être récupérée, mais les cellules en phase M étant souvent en très faible proportion (5% max), les rendements sont minimes. Ils s'améliorent légèrement en effectuant plusieurs agitations espacées sur les mêmes boîtes de cellules. Ils peuvent être augmentés en couplant cette méthode à un blocage chimique, par la thymidine par exemple.

Face aux faibles rendements obtenus par la méthode précédente, d'autres procédés ont été élaborés pour séparer physiquement les cellules d'une population, qu'elle soit synchrone ou pas.

Dans l'un de ces procédés, la première étape consiste à obtenir une suspension monocellulaire, généralement en traitant les cellules par des enzymes protéolytiques ou des agents chélateurs du calcium dont dépend l'agglutination cellulaire. Les cellules peuvent ensuite être sélectionnées suivant leur densité : par centrifugation en gradient de densité sur sucrose (**Mitchison et Vincent, 1965**), sur Ficoll (**Everson et al., 1973**) ou en gradient de SAB (**Mc Donald et Miller, 1970**), il est possible de séparer les cellules volumineuses et denses des cellules de petite taille et légères (revue de **Nias et Fox, 1971**).

Cette technique est malheureusement peu exploitable telle quelle car les cellules en cycle mitotique ne sont pas assez hétérogènes en taille. Cependant, un progrès a pu être apporté par la centrifugation par élutriation (**Lindahl, 1948 ; Meistrich et al., 1977 ; Mitchell et Tupper, 1977**), procédé qui oppose une sédimentation par centrifugation à un flux de tampon : une suspension cellulaire est injectée dans un conduit de rotor en mouvement dans lequel un flux centripète de tampon circule sous l'action d'une pompe. Ce conduit mène à la base de la

chambre de séparation du rotor et, ce dernier tournant à vitesse constante, la vitesse du débit (inverse à la force centrifuge) augmente régulièrement, séparant ainsi les cellules selon leur densité. Ces dernières sortent de la chambre par un conduit central, les petites cellules les premières et les autres à des débits plus élevés. Les cellules ainsi séparées restent vivantes, la séparation étant effectuée de façon douce dans un milieu isotonique. La récupération est directe et la concentration en cellules élevée (Kauffman et al., 1990).

Toutefois la technique de séparation cellulaire la plus fine implique le marquage de cellules spécifiques avec des anticorps couplés à un fluorochrome ou des intercalants des acides nucléiques fluorescents, puis la séparation des cellules marquées des cellules non-marquées dans un trieur de cellules (fluorescence-activated cell sorter) (Freyer et al., 1987). Dans cet appareil, on évalue la fluorescence des cellules individuelles qui circulent sur une seule file dans un léger courant, en leur faisant traverser un faisceau laser (il s'agit du principe du cytofluorimètre de flux). Une canule vibratrice provoque, un peu plus loin en aval, la formation de minuscules gouttelettes dont la plupart ne contiennent qu'une cellule ou aucune. Ces gouttelettes reçoivent automatiquement une charge positive ou négative au moment de leur formation, selon qu'elles contiennent ou non une cellule fluorescente. Elles sont ensuite déviées par un fort courant électrique dans un récipient approprié. Il se forme parfois des grappes de cellules, détectées par leur plus grande dispersion de la lumière, qui restent sans charge et sont rejetées dans un récipient à déchets. Les appareils de ce type peuvent sélectionner une cellule parmi mille et trient environ cinq mille cellules à la seconde.

La combinaison de la centrifugation par élutriation et du trieur de cellules permet d'augmenter sensiblement ces rendements (**Rice et al., 1984**).

L'adaptation d'un certain nombre de ces techniques nous a permis d'utiliser des populations cellulaires à certains stades de croissance en vue de l'étude de la structure de leurs glycoconjugués de surface, notamment la culture à confluence, le double blocage par la thymidine, le blocage par la bisbenzimidazole 33342 et le blocage par la sulfovinblastine.

LES GLYCOCONJUGUES

Les glycoconjugués résultent de l'association par liaison de covalence d'un glucide, qui prend alors le nom de glycanne, à une protéine ou à un lipide conduisant, respectivement, aux glycoprotéines ou aux glycolipides.

Ces composés ont obtenu leurs lettres de noblesse dans les années 60 une fois la démonstration faite qu'ils jouaient un rôle important dans la vie sociale des cellules, grâce à leur intégration dans les membranes, en servant de signaux de reconnaissance et que leur structure était profondément modifiée lors de la cancérisation.

I. ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.

Les membranes de toutes les cellules, qu'elles soient d'origine microorganique, végétale ou animale, présentent la même architecture moléculaire, illustrée par la figure 11 (page suivante) : un double feuillet lipidique parsemé de protéines dites intrinsèques (totalement associées à la membrane) ou extrinsèques (stabilisées par des interactions électrostatiques au niveau des parties polaires des lipides ou des protéines intrinsèques émergeant hors de la membrane) formant une "mosaïque fluide" (**Singer et Nicholson, 1972**).

Le caractère hydrophobe de la double couche monomoléculaire lipidique faisant obstacle aux molécules et ions à caractère hydrophile, les échanges et réactions nécessaires au fonctionnement de chaque compartiment cellulaire mettent en jeu des canaux ou des récepteurs protéiques, par des mécanismes dits actifs, passifs ou facilités.

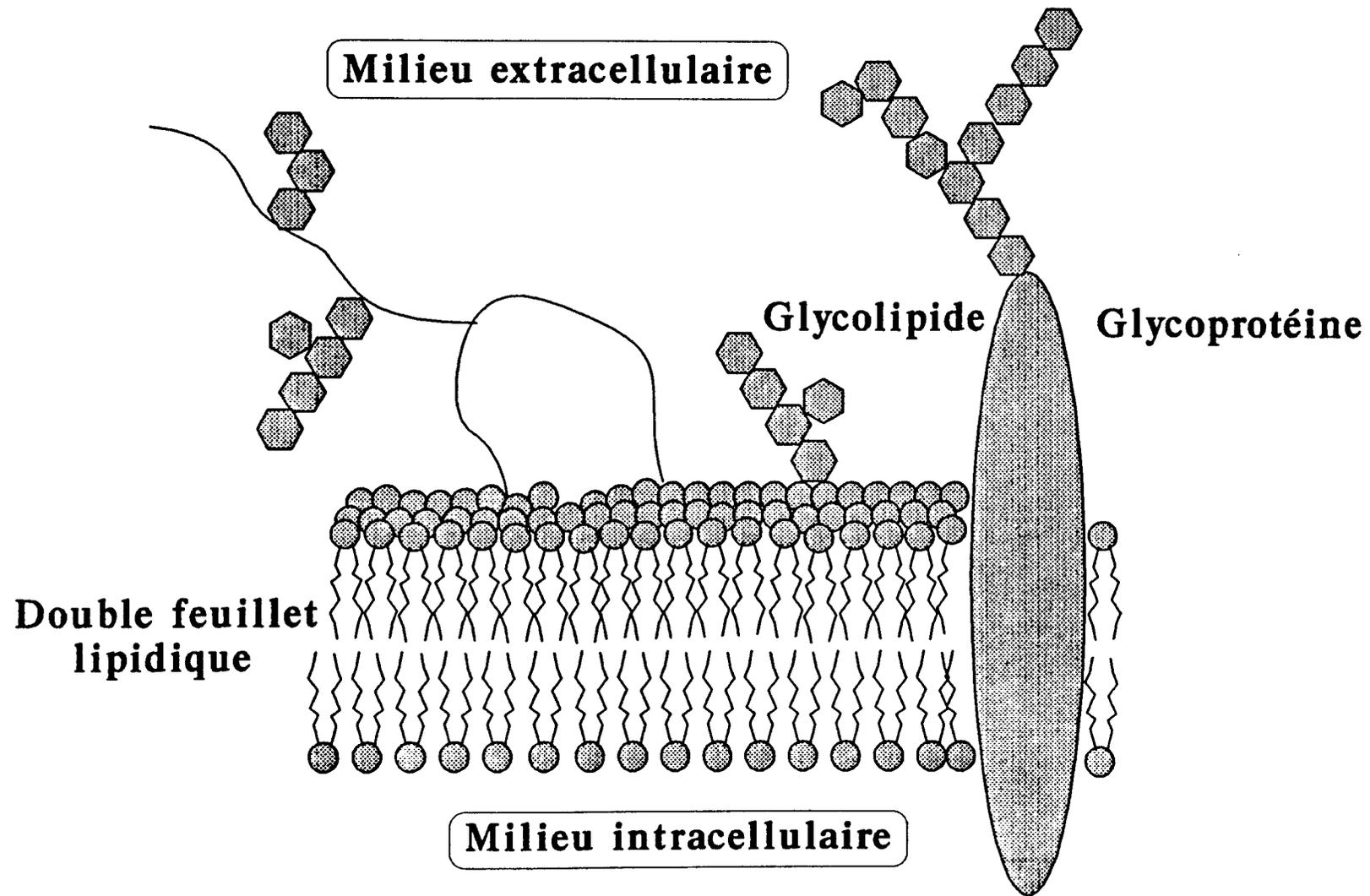


Figure 11 : Représentation schématique de l'implantation des glycoconjugués dans la membrane plasmique.

La membrane qui délimite les contours de la cellule elle-même, séparant ainsi le cytosol du milieu extérieur, constitue donc la première barrière à franchir pour toute molécule venue de l'extérieur, signal hormonal ou nutriment, mais aussi pour tout type d'agresseur comme les toxines ou les virus.

Les interactions de la membrane cellulaire avec le milieu extérieur ou les cellules voisines composant le tissu sont primordiales pour le bon déroulement de la vie cellulaire et tissulaire, ainsi que dans la régulation de la croissance cellulaire ou des phénomènes de différenciation. Une perturbation de ces interactions pourrait occasionner la perte de l'inhibition de contact comme dans le cas des cellules cancéreuses qui se multiplient anarchiquement avant de métastaser (Abercrombie et Ambrose, 1962 ; Emmelot, 1973 ; Hughes, 1975).

Dans la face externe de la membrane sont intégrés glycoprotéines et glycolipides dont les glycanes sont directement en contact avec le milieu extracellulaire et peuvent ainsi servir de récepteurs et d'antigènes (Watkins, 1979 ; Finne, 1980) ou représenter des signaux de reconnaissance (Loomes et al., 1984 ; Koscielak, 1986 ; Suzuki et al., 1986). Ils jouent en outre un rôle important dans le contrôle de la perméabilité membranaire (revue de Hughes, 1976) et sont des marqueurs de différenciation (Hakomori et al., 1981). Ces structures sont spécifiques de la face externe de la membrane plasmique. Cependant, il semblerait que des O-glycanes (Capasso et al., 1988) ou des N-glycanes (Pedemonte et al., 1990) puissent se retrouver sur la face cytosolique de la membrane.

Sept monosaccharides entrent majoritairement dans la composition des glycanes : le D-glucose, le D-galactose, le D-mannose, le L-fucose, le D-xylose, la N-acétyl-D-glucosamine, la N-acétyl-D-galactosamine et les acides sialiques. Les nombreuses combinaisons entre ces sucres expliquent la diversité des structures rencontrées à la surface des cellules.

Parmi ces différents monosaccharides, deux doivent faire l'objet d'une mention particulière : les acides sialiques et le fucose. En effet, tous deux sont toujours en position externe dans les glycanes et le caractère électronégatif des acides sialiques et hydrophobe du fucose font certainement intervenir ces glucides dans la cohésion de l'architecture membranaire, les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion des cellules ainsi que dans les mécanismes de l'inhibition de contact et de la métastase.

Les glycanes représentent 2 à 10% du poids total des membranes (revue de **Alberts et al., 1983**) les plus abondants étant de nature glycoprotéinique (au minimum 80% des sucres membranaires totaux).

Des modifications apportées à ces glycoconjugués membranaires peuvent induire des phénomènes de non-reconnaissance et empêcher toute réponse cellulaire aux facteurs externes de régulation (**Lloyd, 1975**). Leur implication dans de nombreux mécanismes de reconnaissance cellulaire justifie l'abondance des études effectuées sur les modifications de leur structure liées à la transformation maligne.

Ainsi, les premières observations effectuées à l'aide de lectines ont montré que la structure des glycoconjugués et l'architecture des membranes cellulaires étaient profondément modifiées dans les cellules cancéreuses (**Aub et al., 1965a et b ; Burger et Goldberg, 1967 ; Inbar et Sachs, 1969**). La présence de néoantigènes de surface d'origine

glycannique pourrait donc être un des facteurs de l'induction de la transformation cellulaire et de la réponse immunitaire.

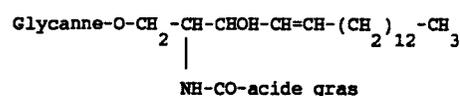
II. STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCOLIPIDES

Sur la base de la structure de leur copule glycannique, les glycolipides sont classés en trois groupes majeurs : les glycosphingolipides, comprenant **gangliosides**, et les glyco-glycérolipides dont le groupe le plus important renferme les **glycérophosphoinositols**. Un quatrième groupe, les **glycosylphospho-polyprénols**, concerne les médiateurs du transport des chaînes glycanniques lors de la biosynthèse des glycoprotéines.

Tous les glycolipides sont localisés principalement dans la monocouche externe de la bicouche lipidique des membranes plasmiques. Ils y sont insérés grâce à leur partie hydrocarbonée et projettent leur partie saccharidique hors de la cellule. Ils sont présents dans les membranes, le plus souvent en faibles quantités (5% de la fraction lipidique totale).

II.1. Les glycosphingolipides.

Les glycosphingolipides sont des molécules amphiphiles formées d'un résidu de sphingosine substitué par amidation d'un acide gras formant une céramide, elle-même substituée par un glycanne sur sa fonction alcool primaire pour constituer ainsi la classe des cérébrosides (revue de **Makita et Taniguchi, 1985**).



II.1.1. Les cérébrosides (ancienne terminologie).

Les cérébrosides sont usuellement classés par rapport à la structure des "noyaux" glycaniques décrits dans le tableau II.

Tableau II : Nomenclature et classification des principales familles de glycosphingolipides.

Préfixes	Abrev.	Structure type
Globo-	Gb	Gal(β1-3)GalNAc(β1-3)Gal(α1-4)Gal(β1-4)Glc
Isoglobo-	iGb	GalNAc(β1-3)Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc
Lacto-	Lc	(Gal(β1-3)GlcNAc) _n (β1-3)Gal(β1-4)Glc
Néolacto-	nLc	(Gal(β1-4)GlcNAc) _n (β1-3)Gal(β1-4)Glc
Ganglio-	Gg	GalNAc(β1-4)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)-Gal(β1-4)Glc
Gala-	Ga	Gal(α1-4)Gal
Arthro-	Ar	GalNAc(α1-4)GalNAc(β1-4)GlcNAc(β1-3)-Man(β1-4)Glc
Mollu-	Ml	Fuc(α1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)Man(β1-4)Glc

Cette classification tient compte du nombre et du type des monosaccharides présents, de leur séquence, de la position et de l'anométrie de liaison ainsi que des autres composants comme les groupements sulfuryles (sulfatides) ou les acides sialiques (gangliosides).

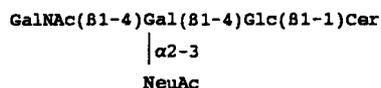
II.1.2. Les gangliosides.

Ce sont des glycosphingolipides sialylés (revue de **Wiegandt, 1985**) contenant, chez l'Homme, essentiellement de l'acide N-acétylneuraminique ou de l'acide N₅,O₉-diacétylneuraminique susceptible d'être un marqueur tumoral humain (**Naiki et al., 1981** ; **Higashi et al., 1984**). Les gangliosides du cerveau des autres vertébrés, exceptées quelques traces d'acide N-glycolylneuraminique (**Tettamanti et al., 1965**),

contiennent l'acide N-acétylneuraminique ou le N₅,O₉-diacétylneuraminique (Ghidoni et al., 1980 ; Chigorno et al., 1982). Les gangliosides de l'hypophyse de Bovidés contiennent de grandes proportions d'acide N-glycolylneuraminique (Clarke, 1975).

En général, les gangliosides proviennent des séries ganglio-, globo- et lacto- (revue de Wiegandt, 1985). La série dont ils sont issus peut dépendre du type cellulaire, de l'étape de différenciation de la cellule et de leur organisme d'origine (Kannagi et al., 1983 ; Kundu et al., 1983).

Ils sont classés suivant leur composition et leur degré de sialylation (Svennerholm, 1963). Ainsi, le ganglioside responsable de la maladie de Tay-Sachs (Geiger et Arnon, 1976 ; Geiger et al., 1977) est le GM₂ (1 acide sialique, 3 sucres neutres) :



D'autres acides sialiques peuvent substituer le premier par une liaison α -2,8 (Tableau III, page suivante).

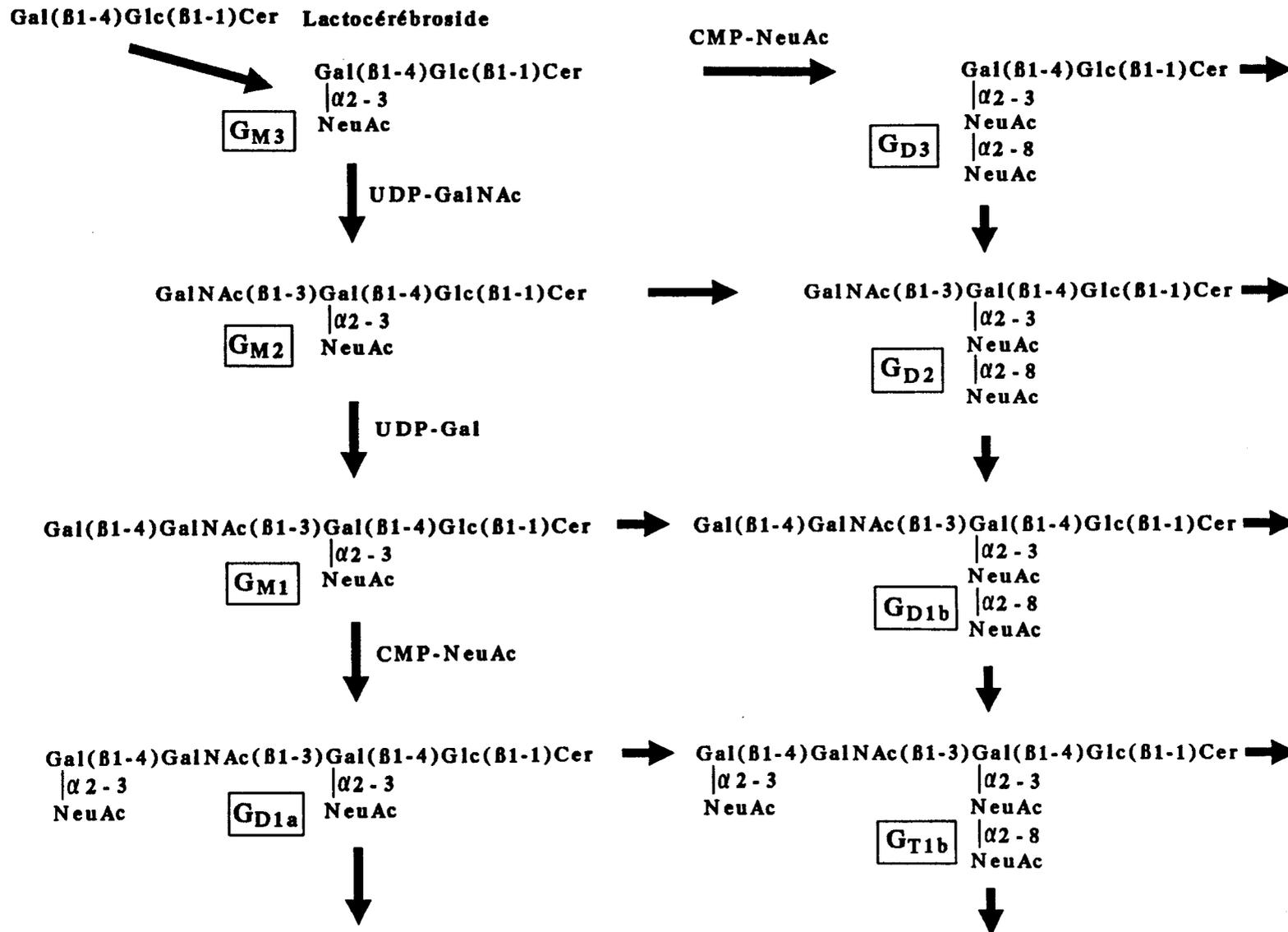
Environ 70 gangliosides différents ont été répertoriés, le fucose pouvant substituer parfois le sucre neutre terminal à la place de l'acide sialique.

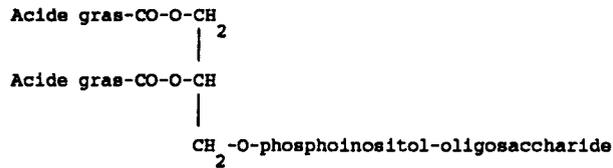
II.2. Les glyco-glycérolipides.

Parmi ces glycoconjugués, nous nous limiterons aux plus importants, les glycérophosphoinositols (GPI).

Ces composés dérivent du glycérol par estérification de deux hydroxyles par des acides gras et greffage d'un phosphoinositol sur le troisième. Ce dernier peut servir de support à des groupements glucidiques.

Tableau III : Principales structures gangliosidiques classées suivant la nomenclature de Svennerholm (1963).





La diversité des différentes espèces moléculaires de glycérophospholipides est d'abord assurée par la nature des têtes polaires : sérine, éthanolamine, monoéthyl et diméthyl éthanolamine, choline, glycérol et glycérophosphate, inositol et inositol mono- ou diphosphate. La nature des chaînes grasses situées en position 1 ou 2 ajoute encore à la complexité structurale.

Ces dernières années plusieurs GPI intervenant dans l'ancrage membranaire de glycoprotéines de surface comme des hydrolases, des antigènes et des molécules d'adhésion ont été décrites (voir revue de Ferguson et Williams, 1988) (Fig. 12).

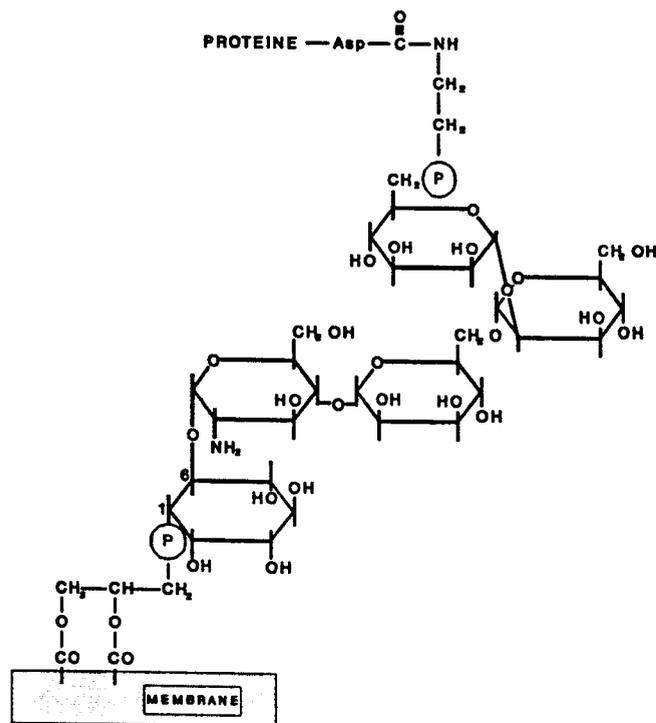


Figure 12 : Structure de base des glycosyl phosphatidylinositols membranaires d'ancrage.

Plusieurs modifications peuvent enrichir cette structure : addition de groupements galactosyl sur le noyau trimannosyl ou de phospho-éthanolamine, de GalNAc ou d'autres résidus mannosyl. L'inositol peut être substitué par un acide gras externe (**Ferguson et al., 1988**).

Une défection dans la biosynthèse des GPI impliquerait le déclenchement de maladies telle que l'hémoglobinurie nocturne paroxysmale, les protéines fixées aux GPI préviendraient une série d'incidents de lyse cellulaire lors de l'activation du complément (voir revue de **Doering et al., 1990**).

III. STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCOPROTEINES

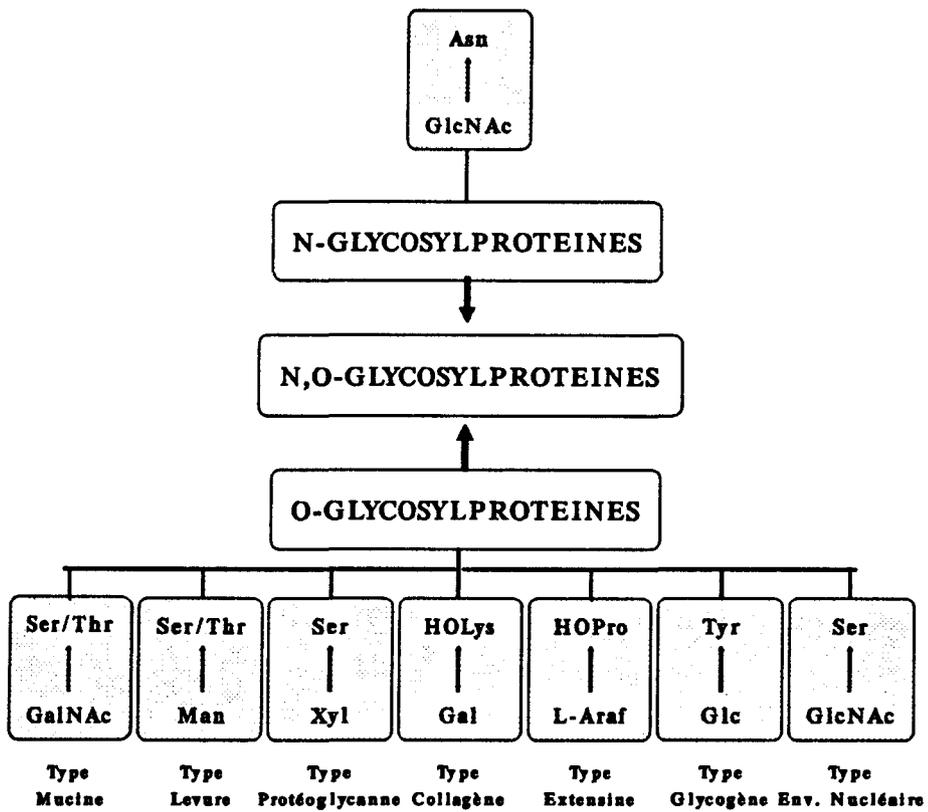
Les recherches menées sur la structure des glycanes des glycoprotéines ont permis de distinguer deux types de liaisons covalentes associant les glycanes aux protéines : les liaisons de type O-glycosidique (O-glycosylprotéines) et de type N-glycosidique (N-glycosylprotéines), certaines protéines comportant les deux types de liaisons (N,O-glycosylprotéines) (revues de **Montreuil, 1984a et b ; Sharon et Lis, 1982 ; Horowitz, 1982**).

Les O-glycosylprotéines présentent une grande richesse de liaisons glycanne-protéine grâce à l'implication de plusieurs monosaccharides (L-arabinose, L-fucose, galactose, glucose, mannose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine et xylose) et plusieurs acides aminés hydroxylés (sérine, thréonine, hydroxyproline, hydroxylysine et tyrosine) ce qui permet de classer ces composés suivant leur mode de liaison (voir Tableau IV).

Les différentes combinaisons des enchaînements et liaisons (anoméries, positions...) entre sucres expliquent la multitude de structures rencontrées. Ainsi, un trisaccharide peut donner 1056 formes

isomériques différentes. L'intérêt porté à l'étude structurale des glycoprotéines a engendré la découverte de dizaines de structures différentes, aux spécificités particulières et donc aux rôles biologiques potentiels nombreux et variés.

Tableau IV : Différentes liaisons glycosidiques caractéristiques des glycoprotéines rencontrées dans la nature.



III.1. Composition globale.

Les glycannes possèdent, aussi bien dans le cas des N- que dans celui des O-glycosylprotéines, trois régions distinctes : le noyau, une séquence répétitive contenant des résidus Gal et GlcNAc et les

terminaisons non réductrices à base de Fuc, Gal, GalNAc et acides sialiques.

Comme dans le cas des glycolipides, la nature des monosaccharides de terminaison peut conférer des propriétés biologiques aux glycoprotéines, tels les groupes sanguins (voir Fig. 13).

Il est à noter que la présence d'un fucose sur le carbone 3 de la dernière osamine en position terminale non réductrice exclue la possibilité de fixation d'un acide sialique sur le galactose (phénomène d'exclusion mutuelle).

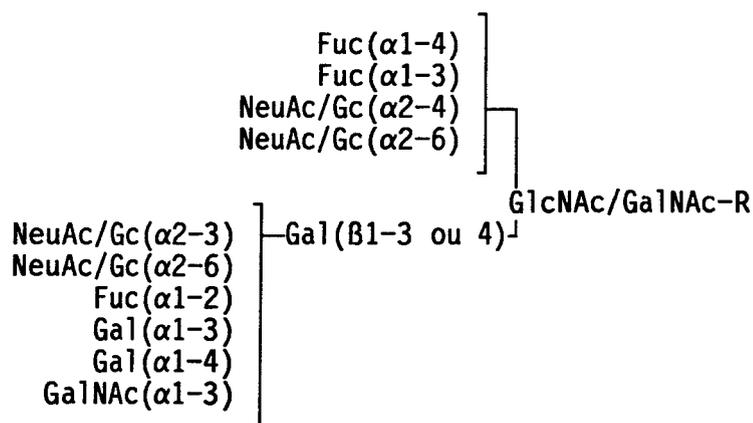


Figure 13 : Différentes possibilités de substitution des séquences répétitives des N- ou O-glycannes par des monosaccharides pouvant leur conférer des propriétés antigéniques.

III.2. Les O-glycosylprotéines.

Le plus simple des oligosaccharides de la classe GalNAc(α1-O)Ser, c'est-à-dire de type "mucine", est le disaccharide :



La plupart des O-glycannes ont cependant au moins deux résidus et forment des structures branchées dont quelques exemples sont donnés dans la figure 14.

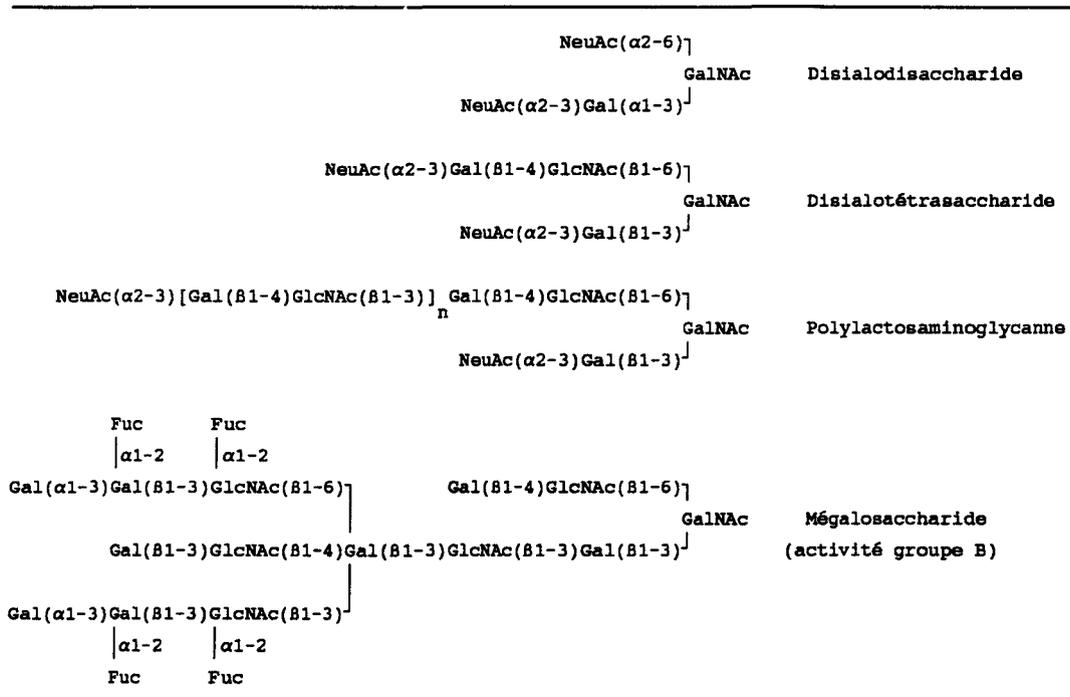


Figure 14 : Exemples d'oligosaccharides liés O-glycosidiquement.

III.3. Les N-glycosylprotéines.

Les différentes structures N-glycosidiques se créent par substitution d'un noyau invariant pentasaccharidique, le mannosido-di-N-acétylchitobiose, par des résidus fucose, galactose, mannose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, xylose ou/et des acides sialiques pour donner trois grandes familles de N-glycosylprotéines (voir revues de Montreuil, 1984a et b) : glycannes de type oligomannosidique, N-acétyllactosaminique et hybride (Fig. 15).

III.3.1. Les glycanes de type oligomannosidique.

Leur nom a pour origine le fait que le noyau pentasaccharidique n'est substitué que par des résidus d' α -mannose. En règle générale, chez les Mammifères, les glycanes comportent de 5 à 9 résidus de mannose (ils peuvent en comporter un très grand nombre dans le cas des levures).

La structure à 9 mannoses se rencontre couramment dans les N-glycosylprotéines, comme dans l'unité A de la thyroglobuline de veau (Ito et al., 1977) d'où il a été caractérisé pour la première fois. Elle peut représenter le précurseur oligosaccharidique commun aux N-glycanes lors de leur biosynthèse. Sa substitution par le trisaccharide $\text{Glc}(\alpha 1-2)\text{Glc}(\alpha 1-3)\text{Glc}(\alpha 1-3)$ représente le signal de transfert du transporteur isoprénique du glycanne sur la protéine acceptrice.

La structure à 5 mannoses est également fréquente et se rencontre par exemple dans le glycopeptide GP-V de l'ovalbumine (Conchie et Strachan, 1978).

III.3.2. Les glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Dans leur cas, le noyau pentasaccharidique est substitué par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et éventuellement par des résidus fucose et/ou des acides sialiques en position terminale non réductrice, c'est-à-dire externe (voir Fig. 15). Le degré de substitution des mannoses provoque un degré d'antennarisation varié de ces glycanes.

Une première hétérogénéité glycanique est donnée par la substitution des mannoses 4 (sur le carbone 4) et 4' (sur le carbone 6) par des "antennes" supplémentaires illustrant le phénomène de polyantennarisation (voir Fig. 15, E).

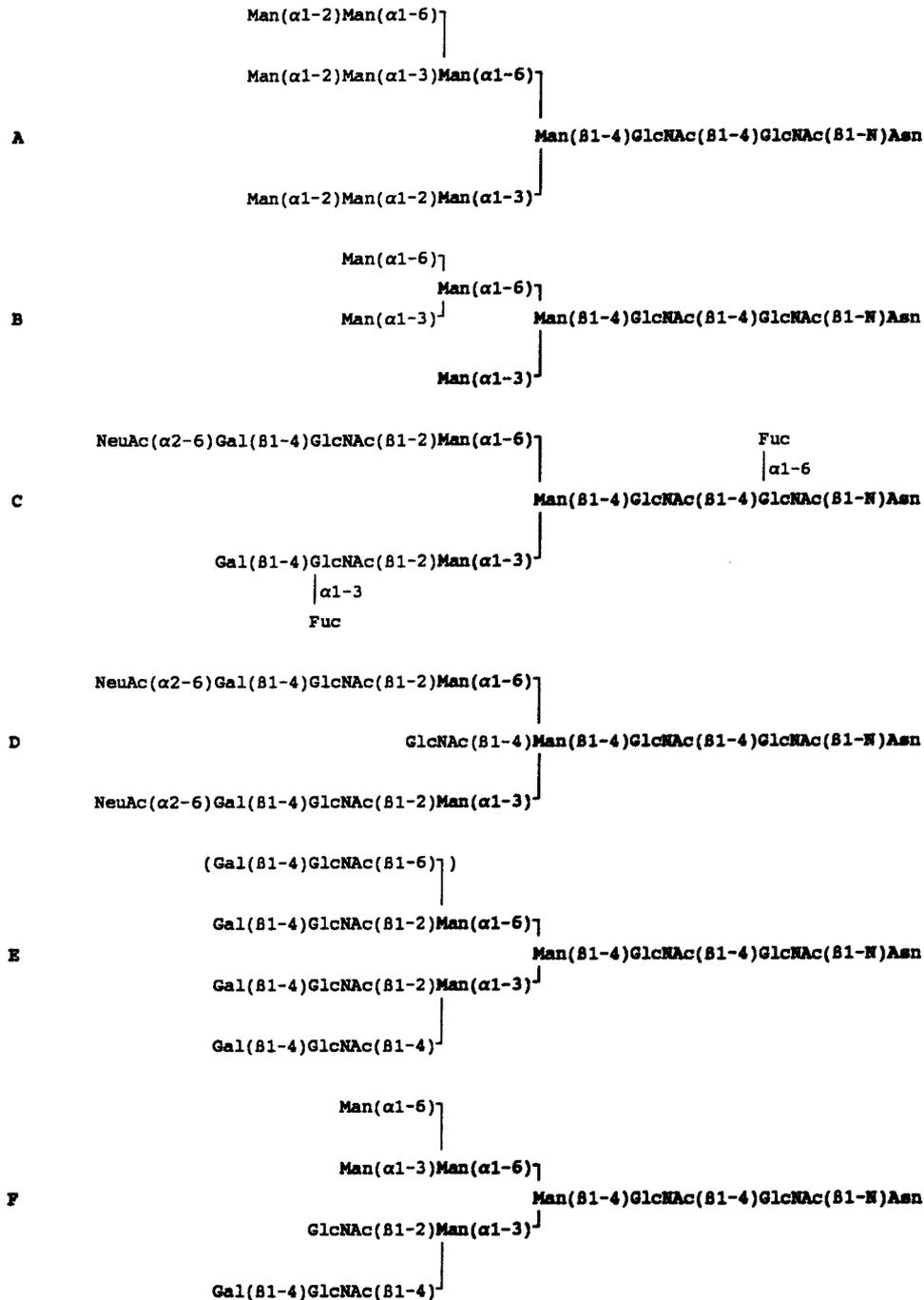


Figure 15 : Les structures de base N-glycosidiques sont obtenues par substitution d'un noyau pentasaccharidique (en gras) : structures oligomannosidiques à 9 (A) et 5 (B) mannoses, structures de type N-acétyllactosaminique biantennées (C), à N-Acétylglucosamine intercalaire (D), tri ou tétraantennées (E), structures hybrides (F).

Des structures penta- et hexaantennées ont également été décrites (François-Gérard et al., 1980 ; Yoshima et al., 1980).

Les différentes antennes peuvent être substituées par un ou plusieurs résidus de N-acétyllactosamine supplémentaires donnant des structures poly-(N-acétyllactosaminique) linéaires ou branchées. Ainsi, dans les membranes des hématies, Koscielak et al. (1976) ont caractérisé des enchaînements de plus de 50 unités de N-acétyllactosamine.

L'addition supplémentaire d'acide sialique peut s'effectuer en position 8 sur d'autres résidus d'acide N-acétylneuraminique (Finne et al., 1977) comme dans les glycoprotéines membranaires NCAM (nervous cell adhesion molecules) qui interviennent dans l'adhésion de cellules nerveuses (Finne, 1975 ; Finne et Makelä, 1985 ; Mac Coy et al., 1985).

Le disialoside NeuAc(α 2,9)NeuAc se rencontre en position terminale de structures poly-N-acétyllactosaminique de glycanes de cellules de carcinome embryonnaire humain (Fukuda et al., 1985).

Enfin, un résidu de fucose peut également substituer le carbone 6 de l'osamine du point d'attache.

III.3.3. Les glycanes hybrides.

Ils comportent des motifs empruntés aux deux autres types structuraux, c'est à dire une partie "oligomannosidique" et des fragments ou des antennes entières de structures de type N-acétyllactosaminique.

La plupart des glycoprotéines membranaires comportent plusieurs glycanes ; une grande partie d'entre elles possèdent à la fois des glycanes liés O- et N-glycosidiquement (O,N-glycosylprotéines) comme

la glycophorine A (Furthmayr, 1977 ; Winzler, 1970) ou à la surface d'hépatocytes en culture (Debray et Montreuil, 1978).

IV. ROLES DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES.

Les données recueillies à ce jour sur le rôle biologique des glycoconjugués membranaires sont assez fragmentaires et ne permettent, dans certains cas, que d'émettre quelques hypothèses.

IV.1. Glycoconjugués et récepteurs membranaires.

Certaines glycoprotéines de surface sont de nature lectinique et sont responsables de la capture de glycoprotéines circulantes, comme le récepteur hépatique d'Ashwell (Morell et al., 1968 ; Ashwell et Morell, 1974) chargé de l'élimination des asialoglycoprotéines circulantes, des cellules âgées ou toute autre entité possédant un galactose terminal non substitué. La fixation et l'internalisation d'hormones comme l'insuline (Jacobs et al., 1977), de toxines comme la ricine, d'agents mitogènes comme la concanavaline A ou l'isolectine L₄-PHA, qui induisent la transformation blastique des lymphocytes, s'effectuent également par l'intermédiaire de tels récepteurs.

D'autres récepteurs sont responsables du transit intracellulaire de glycoprotéines, comme le ciblage des enzymes lysosomiques vers les lysosomes par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique du mannose-6-phosphate (Sahagian et al., 1981 ; Hoflack et Kornfeld, 1985 a et b ; Von Figura et Hasilik, 1986).

Les lectines membranaires vont reconnaître les glycannes d'autres cellules, de protozoaires (Ravdin et al., 1989), de bactéries, de virus

ou de tout autre organite présentant des glycoconjugués de surface (voir revue de **Monsigny et al., 1979**) et en faciliter l'adhésion.

D'autres travaux ont montré que des glycoprotéines de surface étaient également capables d'induire la réassociation de cellules préalablement dispersées (**Greig et Jones, 1977**).

La cohésion tissulaire est assurée par les glycannes des glycoconjugués qui interagissent avec les constituants des matrices extracellulaires : fibronectines, laminine, collagènes et protéoglycannes. Un blocage de la glycosylation perturbe les interactions entre les fibronectines et les cellules composant le tissu.

Quatre grandes familles moléculaires interviennent dans l'adhésion cellulaire : les intégrines, les sélectines (comprenant une sous-unité lectinique), certaines molécules apparentées aux immunoglobulines et les cadhérines.

Ces dernières sont des glycoprotéines intrinsèques de la membrane cellulaire dont le domaine NH_2 terminal déborde largement dans la partie extracellulaire. Elles assurent une adhérence homophile forte permettant l'agrégation de cellules identiques en tissus solides. Elles sont classées selon leur tissu d'origine : les L-CAM (Liver Cell Adhesion Molecules) (**Bertolotti et al., 1980**), les N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecules) (**Finne et Makelä, 1985**). Elles sont également capables de transmettre des signaux du milieu extérieur à la cellule afin d'engendrer des modifications cellulaires.

L'apparition de modifications dans les populations glycaniques peut anéantir ces liaisons et perturber la cohésion des tissus. Des cellules pourraient alors diffuser et métastaser dans des tissus

possédant les récepteurs lectiniques adéquats pour les fixer (revue de **Debray, 1979**).

Plusieurs travaux ont montré que les principaux monosaccharides impliqués dans le phénomène de métastase seraient les acides sialiques et le fucose. Ainsi, des lignées de cellules métastatiques Balb/c 3T3 présentent une sialylation de surface plus prononcée que les mêmes cellules peu ou pas du tout métastatiques (**Yogeeswaran et al., 1979 ; Yogeeswaran et Salk, 1981**).

Dans des mélanomes murins peu métastasants, le taux d'acides sialiques diminuerait parallèlement à l'augmentation du taux de fucose, alors que les cellules présentant ce phénotype inversé seraient très métastasantes (**Finne et al., 1980**). Dans le même domaine, un métabolisme altéré du fucose serait lié à un phénotype de cellules tumorales peu métastatiques (**Dennis et Kerbel, 1981**).

Par contre, du point de vue sialylation, certains auteurs ne mettent pas en évidence de différences significatives dans celle-ci mais plutôt une relation entre l'augmentation du pouvoir métastatique des cellules et la diminution du nombre d'accepteurs glycaniques aux sialyltransférases (**Passaniti et Hart, 1988**).

IV.2. Glycoconjugués et inhibition de contact (voir revue de Wieser et Oesch, 1992).

La croissance cellulaire est dépendante de la quantité de nutriments disponible, de la présence ou de l'absence de certains signaux hormonaux, mais également de la densité cellulaire : cette croissance s'arrête lorsque les cellules normales interagissent physiquement. C'est l'inhibition de contact, phénomène qui disparaît lors de la transformation cellulaire.

Cette inhibition de contact est liée à la présence de certaines structures glycosylées, en particulier la "contactinhibine", une glycoprotéine régulant la croissance cellulaire.

Son activité biologique est portée par des chaînes N-glycanniques, à résidus galactose terminaux libres. La présence d'acides sialiques inhibe le rôle de cette molécule.

Pour être active, elle doit être immobilisée. Elle l'est en particulier avec les fibres cytosquelettiques, par l'intermédiaire de la vimentine, un substrat de la protéine kinase C et de la p34^{cdc2}.

Après adhésion entre cellules, via les CAM, cadhérines ou intégrines, les signaux intracellulaires sont déclenchés et mènent à l'ancrage de la contactinhibine sur le cytosquelette.

Cette molécule interagit alors spécifiquement avec un récepteur, via des résidus de galactose libres, ce qui induit un changement de conformation de ce récepteur suivi de la libération d'un peptide inhibiteur de la croissance cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation/inactivation de kinases, phosphatases ou d'intermédiaires intervenant dans le mécanisme d'action des inositol-phosphates.

La phosphorylation de résidus tyrosine du récepteur inhibe ses interactions avec la contactinhibine.

Le haut degré d'activités de phosphorylation lors de la transformation cellulaire pourrait expliquer la perte de l'inhibition de contact, synonyme de croissance anarchique, suite à la non-fixation de la contactinhibine sur son récepteur phosphorylé.

IV.3. Antigénicité des glycoconjugués membranaires.

Les glycolipides et les glycoprotéines présentent de fortes analogies de séquences glycanniques. Trois unités saccharidiques principales s'y retrouvent et sont à la base des activités antigéniques

ABO et Lewis, après substitution par divers monosaccharides (Koscielak et al., 1973 ; Feizi, 1981). Ces copules immunodominantes sont décrites dans le tableau V.

Tableau V : Principales structures glucidiques porteuses de déterminants antigéniques comme les systèmes ABO et Lewis.

GROUPES ANTIGENIQUES	STRUCTURES
H	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-R} \\ \\ \alpha 1-2 \\ \text{Fuc} \end{array}$
A	$\begin{array}{c} \text{GalNAc}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3 \text{ ou } 4)\text{GlcNAc-R} \\ \\ \alpha 1-2 \\ \text{Fuc} \end{array}$
B	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3 \text{ ou } 4)\text{GlcNAc-R} \\ \\ \alpha 1-2 \\ \text{Fuc} \end{array}$
Le ^a	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc-R} \\ \\ \alpha 1-4 \\ \text{Fuc} \end{array}$
Le ^b	$\begin{array}{cc} \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc-R} & \\ \alpha 1-2 & \alpha 1-4 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array}$
Le ^x	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-R} \\ \\ \alpha 1-3 \\ \text{Fuc} \end{array}$
Le ^y	$\begin{array}{cc} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-R} & \\ \alpha 1-2 & \alpha 1-3 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array}$
i	$\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-)$
I	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)_7 \\ \text{Gal}(\beta 1-) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)_J \end{array}$

Essentiellement portés par les glycolipides, les "immunoglycannes" peuvent également posséder un support de nature protéinique (**Takasaki et al., 1978**).

Ainsi, le système HLA, responsable de la spécificité tissulaire, est également lié aux glycoprotéines membranaires (**Strominger et al., 1974**). Cependant cette propriété est due à la fraction protéique et non à la fraction glucidique.

Les déterminants li caractéristiques de la maturation antigénique lors de la différenciation cellulaire se différencient par l'action d'une β -6-N-acétylglucosaminyltransférase (**Hakomori et Kobata, 1974 ; Feizi, 1981**).

Par contre, la taille et la conformation spatiale des structures glycaniques sont susceptibles de masquer certains sites peptidiques antigéniques et donc occasionnent la perte de cette antigénicité (**Montreuil, 1984b**).

IV.4. Glycoconjugués et perméabilité membranaire.

Le rôle joué par les glycoconjugués dans la régulation de la perméabilité membranaire a été révélé par des travaux montrant que l'inhibition de la glycosylation des protéines perturbait le transport membranaire du glucose ainsi que son métabolisme (**Olden et al., 1979**). La partie glycanique des glycoprotéines est nécessaire au transport des ions minéraux et substances organiques de faible poids moléculaire à travers la membrane plasmique.

Par le contrôle de la perméabilité des membranes cellulaires, les glycannes des glycoconjugués de surface interviennent dans la régulation du métabolisme cellulaire. Toute modification de leur composition ou de leur structure peut mener à des perturbations

métaboliques de la perméabilité membranaire, comme celles rencontrées lors de la transformation cellulaire (Pardee, 1975).

V. CYCLE CELLULAIRE ET GLYCOSYLATION DE SURFACE

Le métabolisme des glycoconjugués est différent pour les glycolipides et les glycoprotéines (voir revues de Makita et Taniguchi, 1985 ; Wiegandt, 1985 ; Conzelmann et Sandhoff, 1987, pour les glycolipides et Kornfeld et Kornfeld, 1985 ; Carraway et Hull, 1989 ; Schachter et Brockhausen, 1989, pour les glycoprotéines). Pour ces dernières, il varie également suivant le type de liaison de la partie glycanique sur la protéine. Tous ces processus de synthèse et de maturation des glycannes sont complexes et régis par des activités enzymatiques rigoureusement séquencées.

En partant du principe que ces enzymes peuvent s'exprimer à des moments différents du cycle cellulaire, il est logique de penser que la cellule présente une hétérogénéité dans sa composition glycanique de surface lors du cycle.

V.1. Implications des glycannes dans la transformation cellulaire.

Des travaux réalisés à l'aide de lectines comme la ConA et la WGA ont montré que la transformation cellulaire affectait la glycosylation des glycoconjugués de surface (Aub et al., 1963, 1965a et b).

D'autres études ont, par la suite, révélé que les cellules transformées présentaient des morphologies glycaniques différentes à plusieurs niveaux :

1) Alors que la tendance générale des glycolipides est la simplification de leurs copules glycaniques (Hakomori et Murakami,

1968), les glycoprotéines voient une augmentation globale de la taille de leurs glycannes par polylactosaminylation, c'est à dire "polymérisation" d'unités disaccharidiques Gal(β 1-4)GlcNAc sur les galactoses terminaux des structures de type N-acétyllactosaminique (Ogata et al., 1976).

2) La transformation est liée à une augmentation de la taille des glycannes par polyantennarisation (Meezan et al., 1969), c'est à dire du nombre de branchements sur les mannoses du noyau pentasaccharidique (Warren et al., 1978 ; Yamashita et al., 1984 ; Debray et al., 1986 ; Pierce et Arango, 1986).

La métastase est associée à une élévation du taux de branches [GlcNAc(β 1,6)Man(α 1,6)Man(β 1)] liée à une activité accrue de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Dennis et al., 1987).

3) Une autre caractéristique mise en évidence est l'hypersialylation des structures N-acétyllactosaminiques et des O-glycannes (Warren et al., 1972 ; Yogeeswaran et Salk, 1981).

Ce taux de sialylation est à rapprocher de celui observé dans les cellules embryonnaires : au stade adulte ce taux diminue. En outre, il a été détecté la présence de nombreux glycannes tri- et tétra-antennés comprenant des enchaînements d'acides sialiques en α -2,8.

4) L'enrichissement en glycannes de type oligomannosidique, comme dans les cellules normales en croissance, est signe d'un métabolisme très actif (Ceccarini, 1975).

5) De nouvelles structures apparaissent : mise en évidence de structures à N-acétylglucosamine intercalaire alors que le phénotype

normal n'en présente pas (Yamashita et al., 1983) ou apparition de glycanes tronqués.

6) De même, apparaissent de nouveaux antigènes liés à la sialylation ou à la fucosylation (Hakomori et Jeanloz, 1970) comme le disialoside NeuAc(α 2-9)NeuAc en position terminale des structures poly-N-acétyllactosaminiques des cellules du carcinome embryonnaire humain (Fukuda et al., 1985).

Les antigènes T et Tn, portés par les O-glycanes, sont retrouvés dans des carcinomes et non dans les tissus sains (Springer et al., 1974).

Certains antigènes embryonnaires comme l'antigène de Forssman (Noonan et Burger, 1971) ou les antigènes SSEA (Stage-Specific Embryonic Antigen) (Kannagi et al., 1983) se retrouvent dans les cellules différenciées et transformées.

Les TAA (Tumor Associative Antigen) :

L'analyse d'antigènes associés aux tumeurs a permis de déterminer la nature glycanique de beaucoup d'entre eux (voir revue de Hakomori, 1989). Initialement, des perturbations structurales de la glycosylation ont surtout été justifiées par l'accumulation de glycolipides fucosylés dans des adénocarcinomes humains tels que les antigènes Le^a, Le^b, Le^x et Le^y (voir tableau V, page 68). Les anticorps qui en ont été synthétisés ont des réactions préférentielles avec les cellules tumorales. Par la suite, d'autres structures tumorales analogues, mais sialylées, comme les antigènes sialyl Le^a, disialyl Le^a et sialyl Le^x (voir tableaux V, page 68 et VI, page suivante) ont été considérées comme faisant partie de la famille des TAA.

Tableau VI : Structures glycolipidiques mises en évidence dans des cancers.

Sialyl Le^a (cancer du colon humain)	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer α2-3 α1-4 NeuAc Fuc
Disialyl Le^a (adénocarcinome du colon)	NeuAc α2-6 Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer α2-3 α1-4 NeuAc Fuc
Sialyl Le^X (cancer du poumon et du sein)	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer α2-3 α1-3 α1-3 NeuAc Fuc Fuc
SSEA-4 (tératocarcinome humain)	Gal(β1-3)GalNAc(β1-3)Gal(α1-4)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer α2-3 NeuAc
D.1.1 (tumeur de cerveau de rat)	Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer α2-3 NeuAc α2-8 O ₉ -AcNeuAc
Antigène de Forssman (carcinome embryonnaire murin)	GalNAc(α1-3)GalNAc(β1-3)Gal(α1-4)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer
Antigène Hanganutziu-Deicher (HD3)	NeuGc(α2-3)Gal(β1-4)Glc(β1-1)Cer

D'autres antigènes sont également associés aux tumeurs, comme l'antigène de Forssman (groupement α 1-3GalNAc) et les antigènes Hanganutziu-Deicher caractérisés par la présence de NeuGc.

Toutes ces modifications vont gravement perturber la cellule dont le phénotype voit apparaître quelques particularités (**Robbins et Nicholson, 1975**) :

- * fluidité et perméabilité membranaire modifiées
- * perte de l'inhibition de contact
- * charges de surface modifiées
- * augmentation de l'agglutinabilité par certaines lectines
- * adhésivité modifiée
- * modifications structurales
- * perte d'antigènes, apparition de nouveaux antigènes

V.2. Les glycoconjugués et la différenciation cellulaire.

Des travaux sur un autre phénomène naturel important, la différenciation ont mis en évidence des variations des glycanes de surface en fonction de l'état de différenciation de la cellule (**Hakomori, 1984** ; revues de **Feizi, 1985** ; **Bourrillon et Aubery, 1989**).

Les glycoprotéines de surface et leurs modifications durant l'embryogenèse jouent un rôle clef lors des événements morphologiques et biologiques des différentes phases de la différenciation cellulaire (**Martinez-Palomo, 1970** ; **Roseman, 1974** ; **Frazier et Glaser, 1979** ; **Edelman, 1983** ; **Lennarz, 1983** ; **Damsky et al., 1984** ; **Ivatt, 1984** ; **Bozzaro, 1985**).

Outre les variations en taille des structures glucidiques de cellules de carcinome embryonnaire lors de leur différenciation (**Prujansky-**

Jacobovits et al., 1979), l'agglutinabilité des cellules est généralement forte lors des stades précoces du développement pour décroître graduellement ensuite et finir par disparaître (**Nicolson, 1974 ; Oppenheimer, 1977**). Ainsi, des embryons de souris aux stades morulae et blastocyte sont reconnus par des lectines à fucose alors que d'autres lectines reconnaissent sans distinction tous les stades (**Dealtry et al., 1987**).

La croissance in vitro de fibroblastes peut être inhibée par des lectines alors qu'elle peut être stimulée à un stade plus tardif (**Aubery et Bourrillon, 1975 et 1976**).

Chez les Mammifères, le développement embryonnaire commence avec l'ovogenèse et progresse par la fertilisation jusqu'au stade du blastocyte. Des oeufs fertilisés et des embryons de Souris en début de division sont agglutinés par la concanavaline A, alors que les oeufs non fertilisés ne le sont pas. Cette fertilisation a donc entraîné des changements dans les structures glycaniques de surface (**Pienkowski, 1974 ; Sobel et Nebel, 1976 ; Magnuson et Stackpole, 1978**). Cette agglutinabilité diminue par la suite pour disparaître au stade du blastocyte (**Rowinski et al., 1976**).

Des cellules de carcinomes embryonnaires peuvent également présenter d'importantes modifications lors de leur différenciation. Ainsi, la PNA qui reconnaît la structure Gal(β 1-3)GalNAc, présente une affinité pour des cellules immatures, mais la perd avec les mêmes cellules différenciées (**Reisner et al., 1977**). En utilisant cette propriété, le fractionnement de thymocytes murins est rendu possible par agglutination des thymocytes immatures par la PNA (**Sharon, 1983**).

La ConA, la WGA et la RCA présentent un maximum d'agglutinabilité sur des oeufs atteignant la maturité, mais la perdent progressivement lors des stades suivants jusqu'à ce que l'embryon ait atteint le stade du blastocyte (Nicolson et Yanagimachi, 1974 ; Yanagimachi et Nicolson, 1976).

Les structures saccharidiques sont donc des marqueurs de surface permettant aussi bien la distinction entre cellules matures et immatures qu'entre cellules normales et transformées.

Plusieurs antigènes de surface varient lors de la différenciation cellulaire ; l'antigène i en fait partie, il est dominant lors de l'embryogenèse et est progressivement remplacé par l'antigène I (voir Tableau V, page 68), phénomène se résumant à l'addition d'un branchement en β -1,6 sur des unités de répétition Gal(β 1-4)GlcNAc (Niemann et al., 1978 ; Watanabe et al., 1979 ; Feizi, 1981).

Un autre antigène, le SSEA-1 ou Lewis x (Stage-Specific Embryonic Antigen) est porté par une N-acétyllactosamine (antigène de type I) fucosylée en α -1,3 (Tableau V, page 68), structure retrouvée dans des cellules embryonnaires, de souris entre autres, mais également dans des adénocarcinomes. L'addition d'un deuxième résidu de fucose (α -1,2) sur le galactose masque l'expression du déterminant SSEA-1 (Gooi et al., 1981). D'autres structures se présentent également comme des marqueurs de différenciation : Le^y, SSEA-3, SSEA-4, H...

La plupart des structures de surface sont caractérisées par la présence de fucose dans le cas des embryons précoces de Souris ou des carcinomes embryonnaires (Muramatsu et al., 1978, 1979a et b, 1980 ; Prujansky-Jacobovits, 1979), ainsi que par la présence de structures poly-N-acétyllactosaminiques (Muramatsu et al., 1983). Ces structures

de poids moléculaire élevé changent considérablement lorsque ces cellules se différencient et disparaissent au profit de glycopeptides de taille plus réduite et de type oligomannosidique, structures retrouvées couramment dans les cellules matures.

Dans le cas particulier des glycolipides, il a été montré que le taux de GM₃ chute dans l'intestin de rat quelques jours après la naissance. De plus l'acide N-glycolylneuraminique remplace progressivement l'acide N-acétylneuraminique (**Bouhours et Bouhours, 1983**).

V.3. Les glycoconjugués et le cycle cellulaire.

V.3.1. Résultats globaux.

L'application de diverses méthodes exploratrices a conduit à la démonstration que les glycoconjugués membranaires subissaient de profondes modifications au cours du cycle cellulaire.

V.3.1.a. Variations de la sialylation.

Des premiers travaux ont montré que des cellules présentaient une mobilité électrophorétique plus élevée en mitose et/ou en G₂ et que l'action d'une neuraminidase atténuait partiellement cette mobilité.

Les acides sialiques en sont donc une des principales causes, mais toutefois d'autres composés doivent intervenir (**Mayhew, 1966 ; Brent et Forrester, 1967**). En effet, dans les cellules CHO, les quantités d'acide sialique par unité de surface durant le cycle ne changent pas et les variations de vitesse électrophorétique observées seraient dûes, selon **Kraemer (1967)**, à un changement de conformation des groupements porteurs d'acides sialiques à la surface cellulaire.

V.3.1.b. Utilisation de lectines.

L'utilisation de lectines marquées a également permis de révéler quelques variations dans la glycosylation des cellules selon leur état de croissance : ainsi, les cellules 3T3 transformées sont reconnues par la WGA (spécifique des résidus d'acide sialique et de N-acétylglucosamine en position intercalaire dans une structure biantennée) et non les cellules normales en interphase. Par contre, lors de la mitose, elles sont également ciblées par cette lectine, ce qui confirmerait une hypothèse rapprochant la morphologie des cellules transformées de celles des cellules normales en mitose (Fox et al., 1971).

Des fibroblastes en mitose fixent plus de concanavaline A que les mêmes cellules en interphase (Pasternak et al., 1974). Les sites de fixation de cette agglutinine diminuent durant la phase G_1 . Si les sites de fixation de la ConA en sont recouverts, les cellules transformées peuvent retrouver le contrôle de leur croissance. Il n'y a pas de diminution du nombre de sites dans les cellules transformées et les cellules continuent de fixer de grandes quantités de Con A durant toute la durée du cycle. Leur surface doit être perturbée et ceci est sans doute en relation avec la perte du contrôle de leur croissance. Cette perturbation de surface se retrouve dans la mitose et serait nécessaire à la poursuite du cycle (Turner et Burger, 1974).

Cette même concanavaline A bloque l'entrée en phase S des fibroblastes d'embryon de Poulet en modulant la mobilité des récepteurs de surface, modulation que ne peut reproduire la succinyl-ConA qui n'induit donc pas de blocage (McClain et al., 1977).

Des modifications du cytosquelette et de la synthèse de l'ADN sont également occasionnées par cette lectine (Bodo et al., 1990).

V.3.1.c. Mesure d'activités enzymatiques.

Une augmentation de l'activité de la galactosyltransférase de surface a été détectée ainsi que la libération de cette enzyme dans les cellules en croissance à la différence de ces mêmes cellules au repos alors qu'il n'y aurait pas libération de sialyl ou de fucosyltransférases dans le milieu (LaMont et al., 1977).

Des activités glycosidasiques ont été mesurées dans les cellules BHK-21 : seules l' α -D-mannosidase et la β -D-glucosidase présentent des activités diminuées de moitié dans les cellules en division (Glick et Buck, 1973). Des mesures identiques dans des cellules KB ont mis en évidence une augmentation d'activité (2 à 6 fois) en fin de phase S (Chatterjee et al., 1975).

V.3.1.d. Utilisation de radioéléments.

Des mesures d'incorporation de précurseurs glucidiques marqués ont montré que, dans les cellules KB, l'incorporation de glucosamine augmentait à la surface juste après la division, que le pourcentage d'incorporation dans les protéines solubles restant constant durant tout le cycle (Gerner et al., 1970) et que les taux de fucose, galactose et mannose diminuaient lors de la mitose alors que le taux d'acide sialique diminuait plus tardivement (Glick et al., 1970).

Dans le cas plus précis des glycoprotéines, l'incorporation maximale de fucose tritié se déroule également en fin de phase S (Nowakowski et al., 1972) de même que la glucosamine dans les cellules murines L (Bosmann et Winston, 1970 ; Gerner et al., 1970) et que le galactose (Chatterjee et al., 1973).

Un maximum d'incorporation de galactose dans les glycosphingolipides a été observé lors des phases M et G₁.

La synthèse des glycosphingolipides en fin de cycle pourrait être expliquée par le fait que les glycosyltransférases des glycolipides sont des glycoprotéines qui sont synthétisées peu de temps auparavant (Chatterjee et al., 1973).

V.3.2. Glycolipides et cycle cellulaire.

Dans le cas général des glycolipides, on n'observe pas de variations de ces structures à la surface des cellules NIL transformées durant le cycle, alors que les mêmes cellules normales présentent une population plus riche en cellules en phase G_1 , surtout en ce qui concerne les tétra- et pentasaccharides des céramides (revue de Hakomori, 1975).

D'autres études confirment l'accumulation de GSLs, série globo, en phase G_1 (Wolf et Robbins, 1974).

Les céramides penta-, tétra- et trisaccharidiques de cellules NIL sont caractérisés par un maximum de marquage en phase G_1 et un minimum en phase S (par action de galactose oxydase suivie de la réduction par le borohydrure tritié). Les concentrations de ces composés seraient constantes durant les diverses phases et les différences de marquage s'expliqueraient par une organisation différente des assemblages de surface (Gahmberg et Hakomori, 1974). Les cellules transformées ne présentent pas une telle hétérogénéité.

V.3.3. Glycoprotéines et cycle cellulaire.

V.3.3.a Intermédiaires de synthèse.

Des travaux concernant les N-glycosylprotéines ont mis en évidence des liens entre la synthèse des intermédiaires lipidiques et la progression du cycle : des cellules cultivées en présence de tunicamycine voient leur état de repos prolongé après la mitose, le même

phénotype étant observé sur les cellules privées de sérum (Larsson, 1985).

La quantité de dolicholphosphate augmente linéairement tout au long du cycle cellulaire pour finir doublée en fin de phase S, par rapport au début de la phase G₁. De même, la CTP-dépendante dolichol kinase, la cis-prényltransférase et la dolichol-pyrophosphatase présentent un regain d'activité lors de la phase G₁ pour atteindre un maximum en phase S alors que l'activité dolichol-phosphatase ne varie pas.

La cis-prényltransférase ou/et le couple kinase/phosphatase réguleraient le taux de dolichol phosphate dans la cellule (Adair et Cafmeyer, 1987).

La présence de tunicamycine dans le milieu de culture de cellules gliales de rat nouveau-né provoque un blocage de la synthèse des glycoprotéines ainsi que celle de l'ADN sans action apparente sur la synthèse protéique. Cette action se déroulerait donc en fin de phase G₁. Il semble que le bon déroulement de la synthèse des glycoprotéines soit nécessaire au bon déroulement de la réplication (Ishii et Volpe, 1987).

D'autres cellules cultivées à confluence présentent un déficit en synthèse du précurseur des dolichols qu'est le mévalonate, ainsi qu'un arrêt de la réplication de l'ADN. En ajoutant du mévalonate ou des dolichols à ces cellules, on provoque un redémarrage de la réplication. Le même phénomène est conservé avec les cellules privées de sérum qui reprennent leur synthèse d'ADN après addition de dolichol mais non après addition de mévalonate. La synthèse du mévalonate est activée par le sérum ou les facteurs de croissance et inhibée par la confluence des cellules, c'est à dire lors de l'entrée en quiescence des cellules (Larsson, 1988).

Le 2-désoxyglucose, un inhibiteur de la synthèse des oligosaccharide-dolichols, bloque la biosynthèse des glycoprotéines en phase G_1 , mais aussi celle de l'ADN en phase S des astrocytes. L'addition de mannose dans le milieu élimine ce processus.

L'action de la monensine, un inhibiteur du transport intracellulaire des glycoprotéines, prévient la progression en phase S. La synthèse de glycoprotéines en phase G_1 suivie de leur transport vers la surface est donc nécessaire à la croissance des astrocytes (Ishii et Volpe, 1990).

Ces résultats sont confirmés par la découverte de mutants cellulaires déficients en intermédiaires glycolipidiques et affectés également dans leur croissance (Nishikawa, 1991).

V.3.3.b. Structures glycanniques de surface.

Ces perturbations dans le métabolisme des intermédiaires de la synthèse des N-glycosylprotéines se retrouvent lors des analyses des structures à la surface des cellules. Ainsi, des fibroblastes BHK-21 en croissance sont enrichis en glycopeptides de surface de poids moléculaires plus élevé par rapport aux mêmes cellules au repos.

Des différences structurales aux alentours de la liaison N-glycosidique s'ajoutent à ces perturbations pondérales (Muramatsu et al., 1973). Cette différence pourrait être due aux variations du taux de sialylation (Warren et al., 1972).

Des extraits tryptiques et pronasiques de cellules BHK-21 en phase exponentielle de croissance présentent par gel-filtration un enrichissement en structures glycanniques lourdes par rapport aux cellules confluentes. Ce phénomène se retrouve chez les mêmes cellules transformées (Buck et al., 1971).

Des cellules épithéliales confluentes comportent une plus grande proportion d'oligosaccharides complexes que les mêmes cellules en croissance, la ConA perdant son efficacité de fixation au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente. Par gel-filtration, il n'y a pas de différences en glycopeptides dans ces cellules, mais les cellules confluentes incorporent deux fois plus de fucose dans les fractions reconnues par la ConA.

Les glycopeptides de faible masse sont plus nombreux dans les cellules confluentes, ceci étant dû à une quantité moindre d'acides sialiques dans la composition de leurs glycannes.

L'inhibition de la croissance cellulaire par l'acide rétinolique ou le cortisol n'entraîne pas de différences avec les cellules subconfluentes. Les altérations des structures oligosaccharidiques ne dépendraient pas de la croissance cellulaire, mais de la densité du milieu en cellules (Sasak et al., 1982 et 1983).

L'analyse en gel-filtration de glycopeptides de fibroblastes BHK-21 bloqués en métaphase à l'aide de sulfo-vinblastine révèle une proportion de structures lourdes à fucose similaire à celle provenant de cellules en croissance rapide ou de cellules transformées (Glick et Buck, 1973).

Ces mêmes cellules en métaphase présentent une décroissance de 43% de leur taux d'acides sialiques par rapport aux autres cellules.

Les cellules bloquées par la thymidine présentent un taux d'acides sialiques similaire à celui des cellules en croissance exponentielle. La différence observée chez les cellules bloquées par la sulfo-vinblastine n'est donc pas due à l'arrêt de croissance. D'autre part, le taux de fucose incorporé est triplé dans les cellules en métaphase par rapport aux cellules en interphase (Glick et Buck, 1973).

VI. CONCLUSIONS.

Si nous voulons résumer ces quelques travaux préliminaires concernant les glycoprotéines, nous devons retenir principalement le fait que la composition des structures glycaniques est susceptible de varier et d'entraîner une évolution en taille de ces glycannes : celle-ci augmenterait dans les cellules en répllication active par rapport aux cellules confluentes (certains auteurs différenciant densité et croissance cellulaire). Les cellules en mitose auraient évidemment un phénotype glycanique identique aux cellules en croissance et les structures moins complexes auraient des taux plus importants dans les cellules en division et une affinité plus grande pour une lectine comme la concanavoline A.

Ces remarques nous ont donc incités à analyser plus précisément les bouleversements structuraux potentiels de la surface cellulaire lors de chacune des quatres phases du cycle mitotique.

Notre travail a donc consisté à préparer des populations fibroblastiques enrichies en phases G_0/G_1 , S, G_2 et Mitose.

Les structures glycaniques des glycoprotéines membranaires ont ensuite été étudiées sous la forme de glycopeptides par une série de fractionnements par chromatographie de gel-filtration, puis d'affinité sur lectines immobilisées.

Cette recherche a nécessité la mise au point d'un fractionnement d'oligosaccharides et de glycopeptides par chromatographie d'affinité à haute performance sur lectines immobilisées sur silice.

TRAVAUX
PERSONNELS

Choix des méthodes de synchronisation.

I. MATERIELS ET METHODES.

I.1. Modèles expérimentaux.

I.1.1. BHK-21 (Baby Hamster Kidney).

Ces cellules sont des fibroblastes de rein de Hamster syrien nouveau-né Mesocricetus aureatus (Fig. 16, page suivante), établis en lignée (BHK-21) depuis 1961 (Macpherson et Stoker, 1962). Elles sont cultivées (au laboratoire, par Myriam Lecocq) dans un milieu MEM de Glasgow (BHK-21) Gibco (Macpherson et Stoker, 1962) additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né, de bicarbonate de sodium (2,75g/l), de bactotryptose, d'antibiotique (auréomycine à 5mg/l) et de fungizone à 2,5mg/l. Les cultures sont réensemencées deux fois (en sept boîtes) par semaine.

Les mêmes cellules transformées par le virus du sarcome de Rous (cellules HSV) sont cultivées dans le même milieu que les BHK-21 normales, mais sont réensemencées en quatre boîtes, deux fois par semaine.

I.1.2. NIH 3T3.

Il s'agit de fibroblastes sains de Souris. Ces cellules sont cultivées (Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Laboratoire de Maud Collyn-d'Hooghe) dans un milieu MEM modifié (Dulbecco) additionné de 10% de sérum de Veau nouveau-né décomplémenté et d'amphotéricine B (Boehringer) à 0,25 μ g/ml. Elles sont réensemencées (en huit ou dix) deux fois par semaine.

Les mêmes cellules transformées par l'oncogène ras (EJ-ras), après transfection par la technique au phosphate de calcium et les foyers

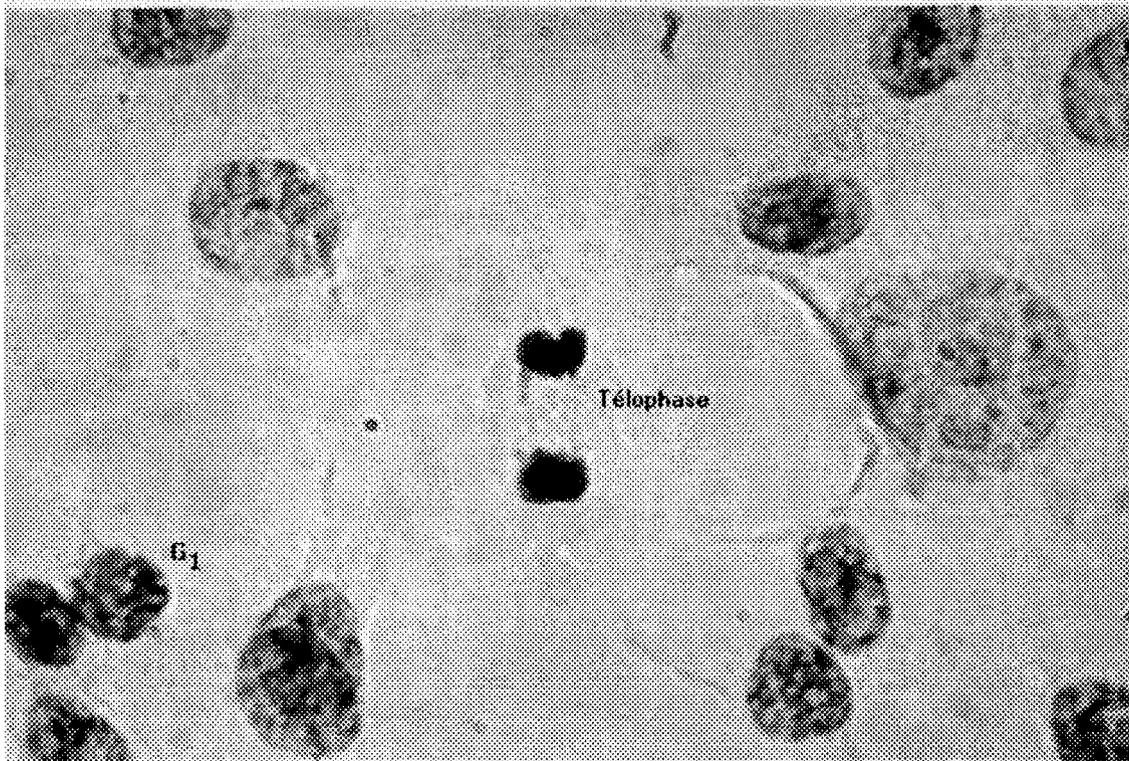
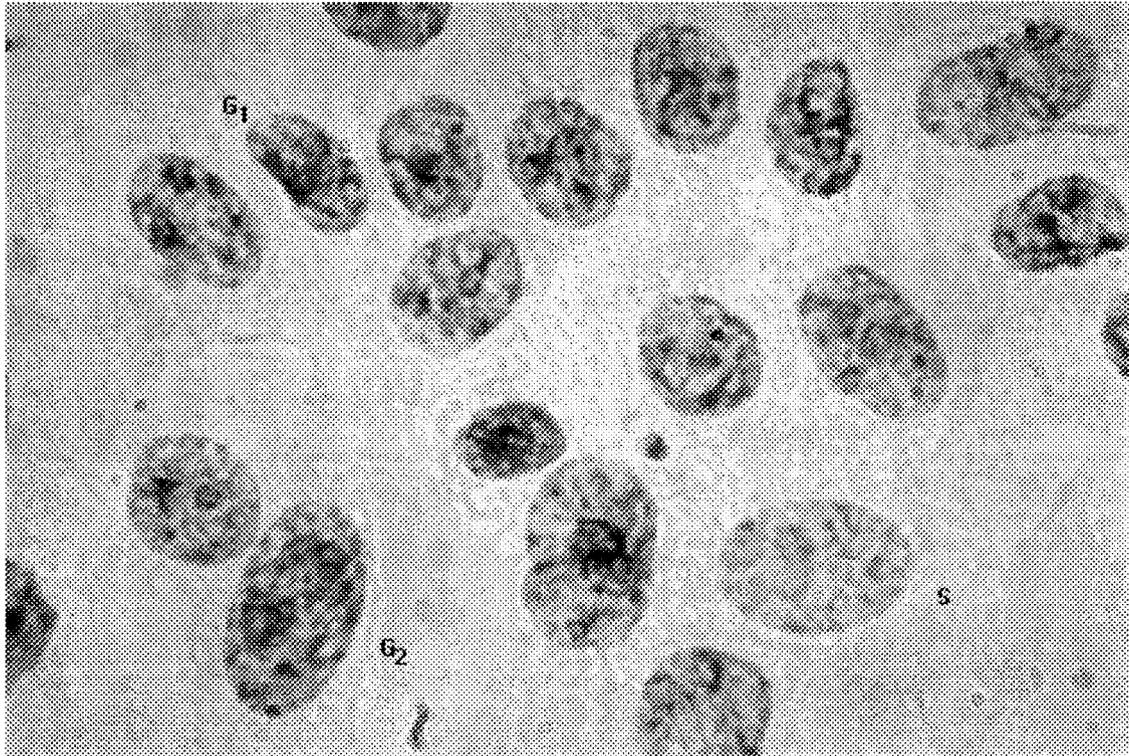


Figure 16 : Photographies (X 400) représentant des fibroblastes BHK-21 répartis dans les quatre phases du cycle cellulaire et colorés par la méthode de Feulgen.

obtenus ont été amplifiés et maintenus en culture. Elles sont cultivées dans les mêmes conditions que les NIH 3T3 normales.

I.1.3. Fixation.

Toutes ces cellules sont décollées par une solution d'Earle EDTA (EDTA 5,5mM, Glc 5,5mM, KCl 5,4mM, NaCl 120mM, NaHCO₃ 26mM, NaH₂PO₄.H₂O 1mM), mises en suspension à l'aide d'une pipette, puis rincées trois fois par du PBS. Chaque culot cellulaire est repris par 2ml de PBS et les cellules sont fixées par addition d'éthanol froid à 70%, goutte à goutte, sous agitation.

Elles sont ensuite conservées à 4°C en attendant leur analyse ou l'extraction de leurs glycoprotéines membranaires.

Les populations cellulaires ont été analysées dans un premier temps à l'aide d'un cytomètre SAMBA 200, puis à l'aide d'un cytofluorimètre de flux après coloration des noyaux par un marqueur approprié : réactif de Schiff dans le premier cas et iodure de propidium dans le second.

I.2. Analyses au cytomètre SAMBA.

I.2.1. Matériel.

Nos premières déterminations de l'état de croissance de populations cellulaires ont été effectuées à l'aide du cytomètre SAMBA 200 (Alcatel) (Brugal, 1976, 1984 et 1985 ; Brugal et al., 1979 ; Moustafa et Brugal, 1984) par le Professeur Bernard Lassalle de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I.

Cet appareil est composé d'un microscope couplé à un analyseur d'images pouvant mesurer l'intensité de coloration des noyaux cellulaires après marquage par un colorant spécifique, cette intensité étant proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire. Un intégrateur calcule le

nombre de cellules réparties dans chaque phase du cycle, c'est-à-dire par unité de coloration donnée.

Nos analyses s'effectuent par sélection d'échantillons de 300 cellules environ

I.2.2. Coloration des cellules.

Les cellules fixées sont réhydratées et une partie est prélevée pour être déposée sur une lame de microscope dans une goutte d'acide acétique (45%). Sur une plaque chauffante (40°C), une deuxième lame est appliquée sur la première pour étaler les cellules par écrasement.

Le bloc composé des deux lames est ensuite placé à -70°C (15mn minimum).

Les noyaux sont colorés par la méthode classique de Feulgen (**Feulgen et Rossenbech, 1924**) : les lames sont sorties du congélateur à -70°C et séparées immédiatement à l'aide d'un scalpel pour être trempées dans un bain d'alcool à 70%. Les cellules subissent une série de bains d'alcool successifs (96%, puis 100%). Les lames sont ensuite trempées dans du collodion (0,2% dans l'éther), égouttées et séchées à l'air libre durant 30 sec.

Le matériel nucléaire cellulaire est hydrolysé par de l'HCl 5N durant 30mn et les étalements cellulaires sont ensuite rincés à l'eau.

La coloration s'effectue 1h à l'obscurité dans du réactif de Schiff préparé de la manière suivante : 0,5g de pararosaniline est additionné de 1g de métabisulfite de sodium et 1ml d'HCl concentré dans 90ml d'eau. Le réactif est agité jusqu'au changement de teinte, puis 0,5g de charbon de bois actif y est ajouté pour le décolorer. La solution est filtrée avant utilisation.

Les lames sont rincées dans trois bains successifs d'eau sulfiteuse (20ml d'HCl, 20ml de bisulfite de sodium 10%, QSP 300ml H₂O), puis à l'eau distillée.

Les cellules subissent ensuite une nouvelle déshydratation par une série de bains d'alcool (80, 96, 100, 100%) suivis de trois bains de toluène.

Finalement, une lamelle est montée dans une goutte de résine. Le tout est séché dans une étuve à environ 35-40°C avant analyse.

I.3. Analyses en cytofluorimétrie de flux.

I.3.1. Matériel.

La cytofluorimétrie de flux (Melamed et al., 1979) est une technique fondée sur l'utilisation de fluorochromes qui fluorescent sur une certaine longueur d'onde lorsqu'ils sont excités par une lumière de longueur d'onde différente. L'intensité de la lumière fluorescente émise est proportionnelle à la quantité de colorant présent. Par conséquent, lorsque l'on expose à un faisceau de lumière rouge une cellule dont l'ADN a été marqué par un fluorochrome, comme l'iodure de propidium ou le bromure d'éthidium, celle-ci émet une lumière d'intensité proportionnelle à la quantité d'ADN qu'elle contient.

Les cellules marquées sont séparées et mises en suspension pour pouvoir passer rapidement les unes après les autres (à la vitesse de plusieurs milliers par seconde) dans un tube capillaire très fin placé dans le champ d'un faisceau laser. Lorsqu'une cellule passe dans le capillaire, le fluorochrome lié à son ADN est excité par le laser et émet de la lumière dans toutes les directions. L'intensité de la lumière émise est mesurée par une cellule photoélectrique disposée en dehors du faisceau laser, et enregistrée par une fluorimètre.

Nous utilisons un cytofluorimètre FACScan (Becton Dickinson) équipé d'un laser à argon émettant à 480nm et d'un filtre à bande passante étroite, centré sur 625nm pour permettre la détection de la lumière rouge.

Cet appareil permet également la mesure de deux autres paramètres. Lors du passage de la cellule à travers le faisceau lumineux, la lumière émise est diffractée selon deux dimensions : une diffraction axiale proportionnelle à la taille de la cellule (Forward Scatter) et une diffraction à 90° proportionnelle à la structure interne de la cellule (Side Scatter).

Ces paramètres : taille, structure et fluorescence, permettent l'analyse des cellules sous forme de cytogrammes sur lesquels il est possible de sélectionner la population cellulaire intéressante pour en effectuer l'étude sous forme d'histogrammes.

I.3.2. Coloration des noyaux.

Les cellules fixées sont rincées trois fois par du PBS. L'ARN cellulaire est hydrolysé par 5ml de RNase (Sigma) à 1mg/ml, préalablement décontaminée des traces de DNase par chauffage, pendant 10mn à 100°C.

La coloration s'effectue par addition de 20µl d'iodure de propidium (Sigma) à 1mg/ml, deux heures à l'obscurité et à 4°C.

Les cellules sont ensuite passées directement au cytofluorimètre.

I.3.3. Interprétation.

Les diagrammes obtenus permettent de différencier les sous-populations cellulaires (Fig. 17A) : un premier pic correspond aux cellules en phase G_0/G_1 , un deuxième comprend les cellules en phases G_2/M . Quant à la zone comprise entre ces deux pics, elle représente les

cellules à différents stades de la phase S, avec des quantités croissantes de chromatine.

II. SYNCHRONISATIONS.

Les synchronisations cellulaires ont été effectuées dans le laboratoire du Dr. Maud Collyn-d'Hooghe de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

II.1. Synchronisation en phase G₁.

Pour obtenir des cellules à confluence, plusieurs études ont été effectuées. Les cellules arrivent en inhibition de croissance au bout de quatre jours pour les BHK-21, HSV, NIH ras et de 5 à 8 jours pour les NIH normales.

Ces résultats sont confirmés par les différents histogrammes obtenus comparés à ceux des cultures en phase exponentielle (Fig. 17).

Une autre méthode assez "naturelle", consistant en la privation des cellules en certains nutriments par appauvrissement du milieu en sérum, n'apporte pas de meilleurs résultats dans les rendements en G₀/G₁, aussi bien dans le cas de cellules normales que dans le cas de cellules transformées (Fig. 18).

Les cellules cultivées à confluence (plateau tardif) s'accumulent naturellement en G₀/G₁ (nous n'en ferons pas la distinction) ; cette méthode sera donc celle sélectionnée pour obtenir un enrichissement cellulaire dans la première phase du cycle mitotique.

En règle générale, suivant les conditions de culture et de croissance, les cellules sont réparties dans les différentes phases de la mitose avec les proportions décrites dans le tableau VII.

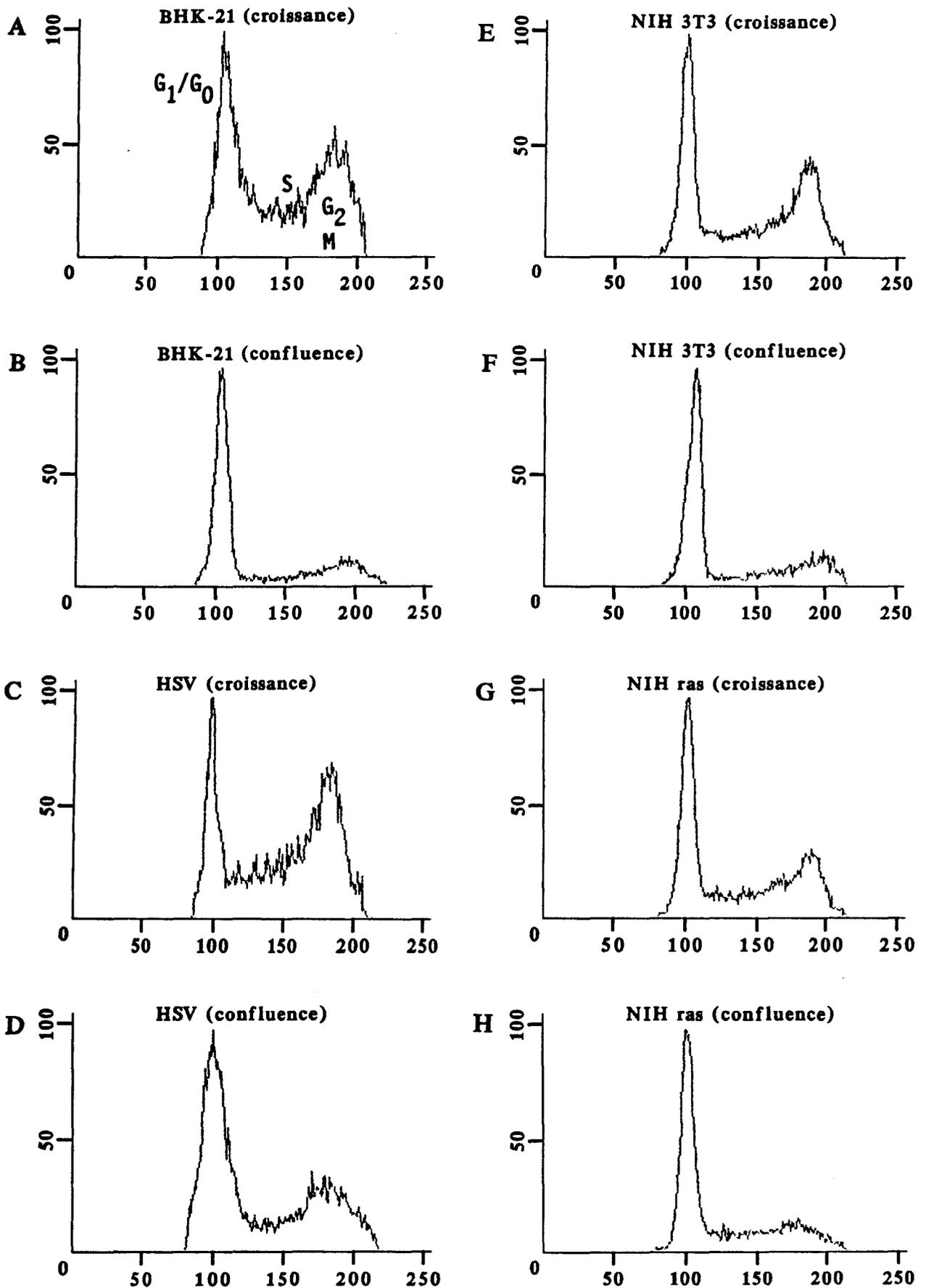


Figure 17 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes BHK-21 (A et B), HSV (C et D), NIH 3T3 (E et F), NIH ras (G et H) en phase exponentielle de croissance (1 à 2 jours) (A, C, E, G) ou cultivés à confluence (4 jours pour les BHK-21, HSV, NIH ras ; 5 à 8 pour les NIH 3T3) (B, D, F, H).

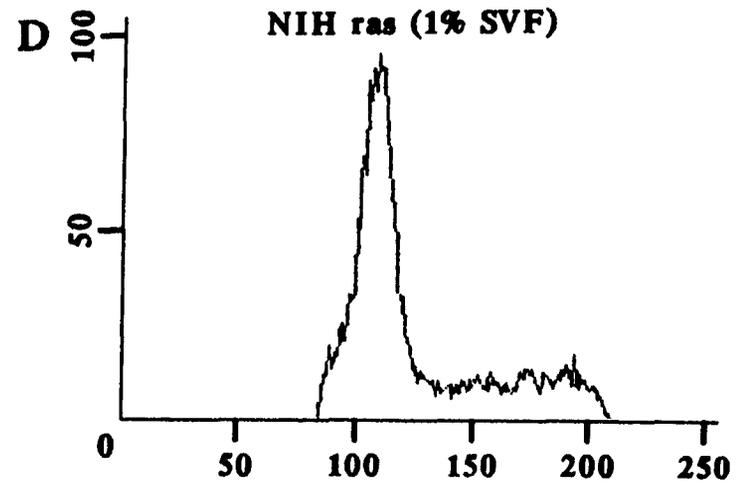
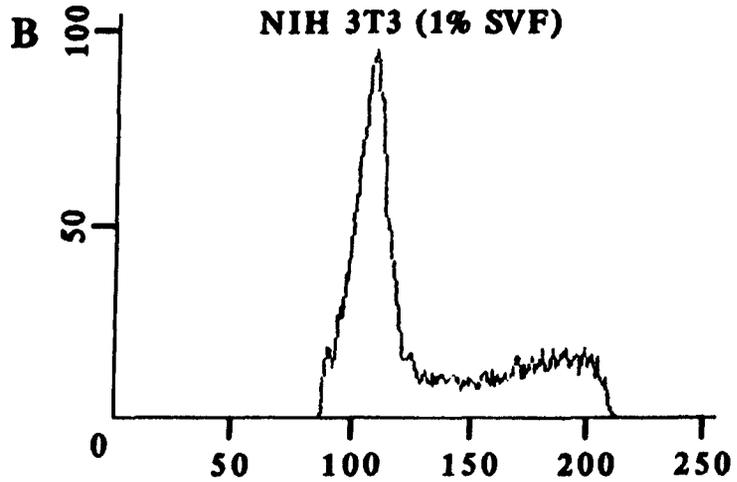
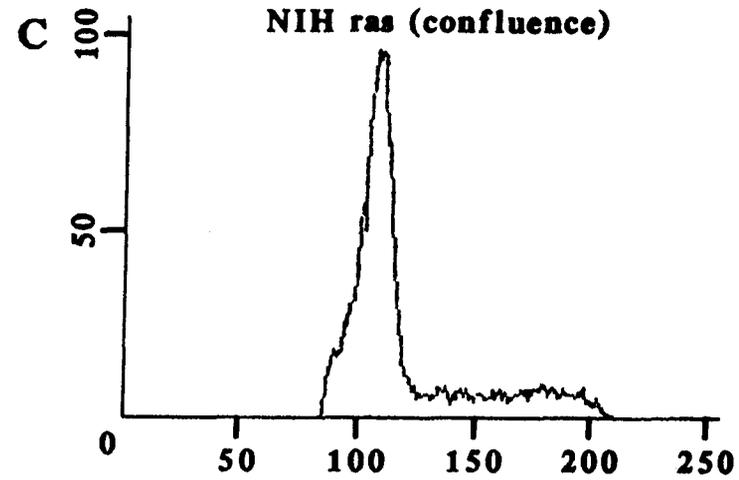
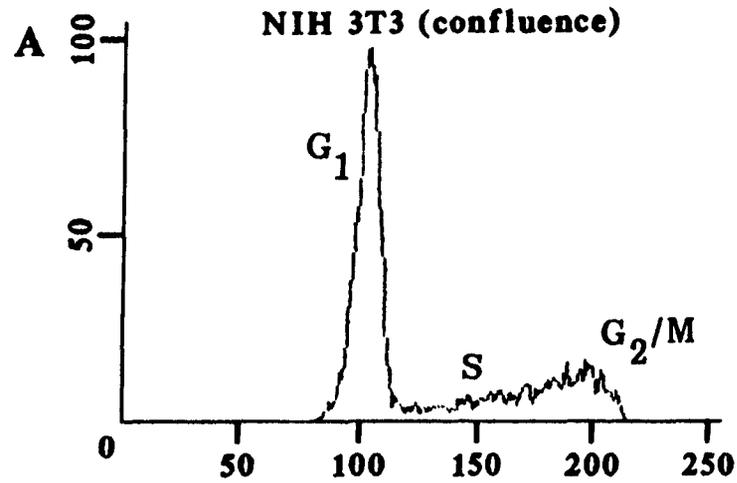


Figure 18 : Histogrammes de fibroblastes NIH normaux (A et B) et transformés par l'oncogène ras (C et D) cultivés à confluence (A et C) ou dans un milieu pauvre en sérum de veau foetal (1%, B et D).

Tableau VII : Répartition des fibroblastes BHK-21, HSV, NIH 3T3 et NIH ras dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur état de croissance : phase exponentielle (EXPO) ou culture à confluence (PLATEAU).

		G_0/G_1	S	G_2/M
BHK-21	EXPO	29-40%	34-51%	24-40%
	PLATEAU	68-90%	6-20%	4-14%
HSV	EXPO	30-50%	23-33%	22-42%
	PLATEAU	55-70%	18-30%	10-20%

		G_0/G_1	S	G_2/M
NIH3T3	EXPO	40-50%	23-31%	19-32%
	PLATEAU	65-82%	10-24%	6-15%
NIHras	EXPO	46-56%	28-32%	16-22%
	PLATEAU	60-71%	19-27%	10-17%

II.2. Synchronisation en phase S.

II.2.1. Double blocage par la thymidine.

Pour obtenir des cellules en phase S, la méthode la plus couramment utilisée est le double blocage par la thymidine dont nous avons décrit le principe dans les généralités (Studzinski et Lambert, 1969).

Nous avons employé cette méthode dans les conditions suivantes : les cellules en phase exponentielle de croissance subissent un premier blocage par addition de thymidine dans le milieu à une concentration finale de 4mM et ceci durant 15 à 17h. Le milieu est ensuite changé et les cellules sont cultivées dans des conditions normales durant 10 à 12h.

La deuxième incubation en présence de thymidine s'effectue une quinzaine d'heures également. Les cellules s'accumulent alors à l'interface G_1/S . Elles sont remises en culture et analysées à différents

temps après le changement de milieu (Fig. 19 à 21) ; il s'avère ainsi que, en moyenne, quatre heures après la levée du blocage, une majorité de cellules se trouve en milieu de la phase S, ce qui approche le résultat que nous espérions obtenir.

II.2.2. Blocages chimiques.

Différents essais de blocage métabolique par des composés comme l'aphidicoline (Matherly et al., 1989) ont été effectués mais n'ont pas donné l'accumulation recherchée (Fig. 22). Par contre, le double blocage par la thymidine étant assez efficace dans le cas des cellules normales et transformées et représentant la méthode la moins perturbatrice du métabolisme cellulaire, nous avons retenu cette méthode pour les études du dernier chapitre.

II.3. Synchronisation en phase G₂.

II.3.1. Synchronisation par sédimentation.

Afin d'éviter les incertitudes relatives à l'emploi d'agents bloquants (pouvant interférer avec le métabolisme), nous avons tout d'abord privilégié la recherche de méthodes "physiques" de synchronisation.

Ainsi, partant du principe que les cellules en G₂ sont plus denses que celles en G₁, nous avons tenté de fractionner différentes populations cellulaires sur des colonnes de milieu de culture avec ou sans sérum, puis de MSL (milieu de séparation de lymphocytes) (dilué à 25% dans du milieu de culture).

Les résultats étant négatifs (nous n'avons pas détecté de zones enrichies en l'une des phases), quelques tentatives ont été effectuées sur gradient de séralbumine bovine (1-5% puis 1-10%), puis par plusieurs centrifugations en gradient de Percoll (à 25% dans du sucrose 0,25M ; tampon Hepes 10mM). Ces tentatives ont également échoué.

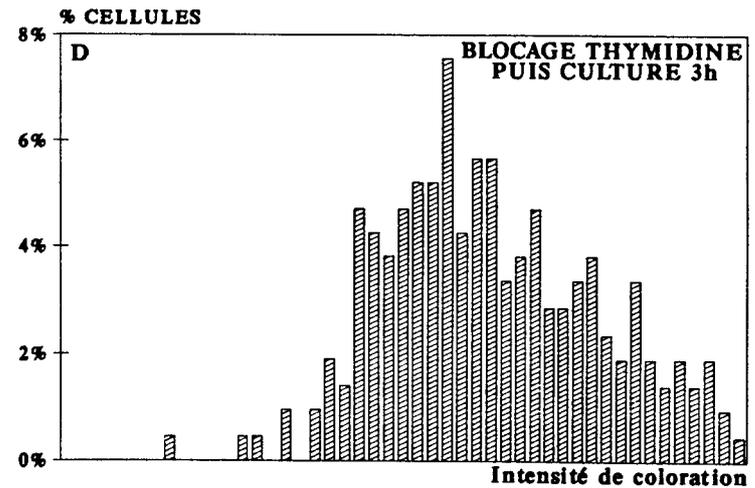
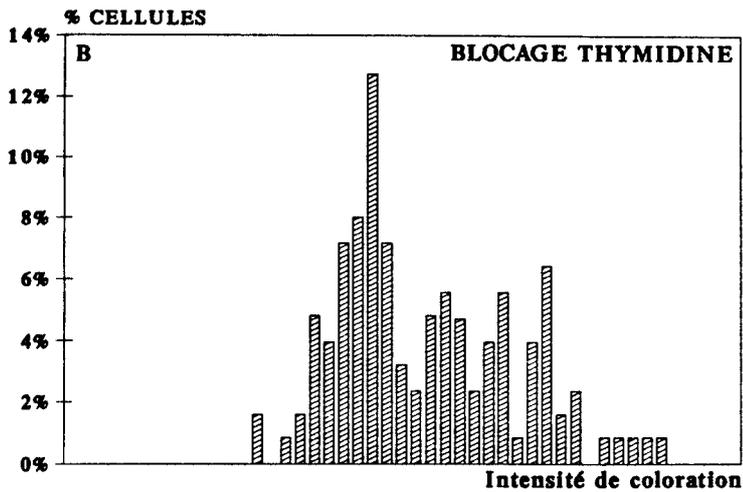
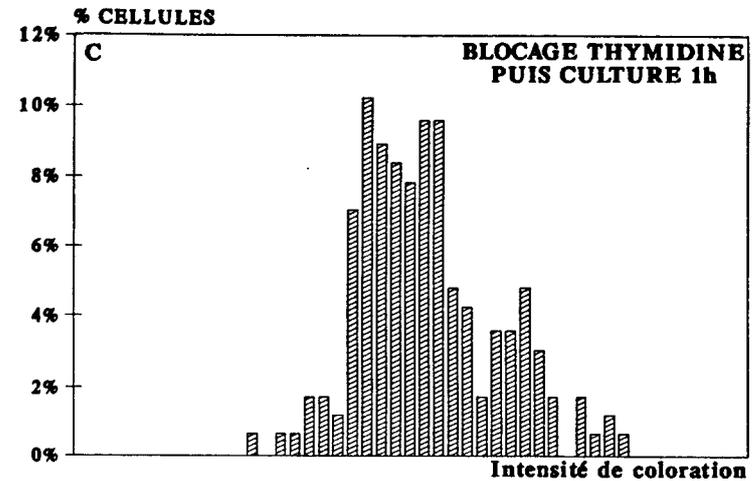
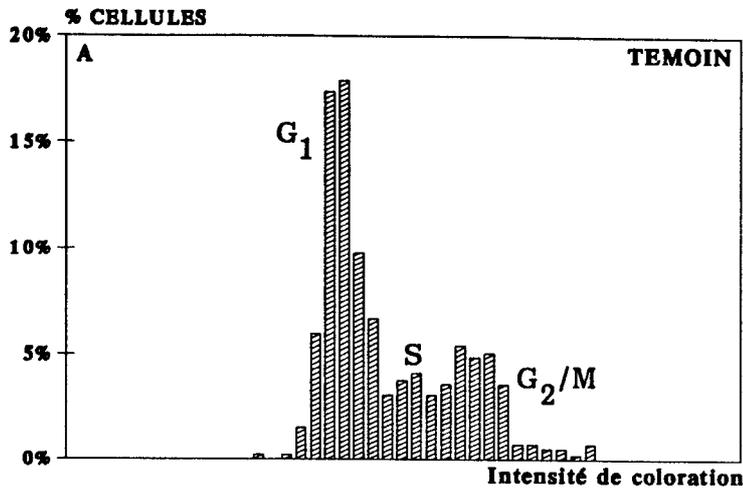


Figure 19 : Histogrammes (SAMBA 200) de fibroblastes NIH 3T3 synchronisés par un double blocage thymidine (B), remis en culture 1h (C) et 3h (D) comparés à un témoin composé de cellules en phase exponentielle de croissance (A).

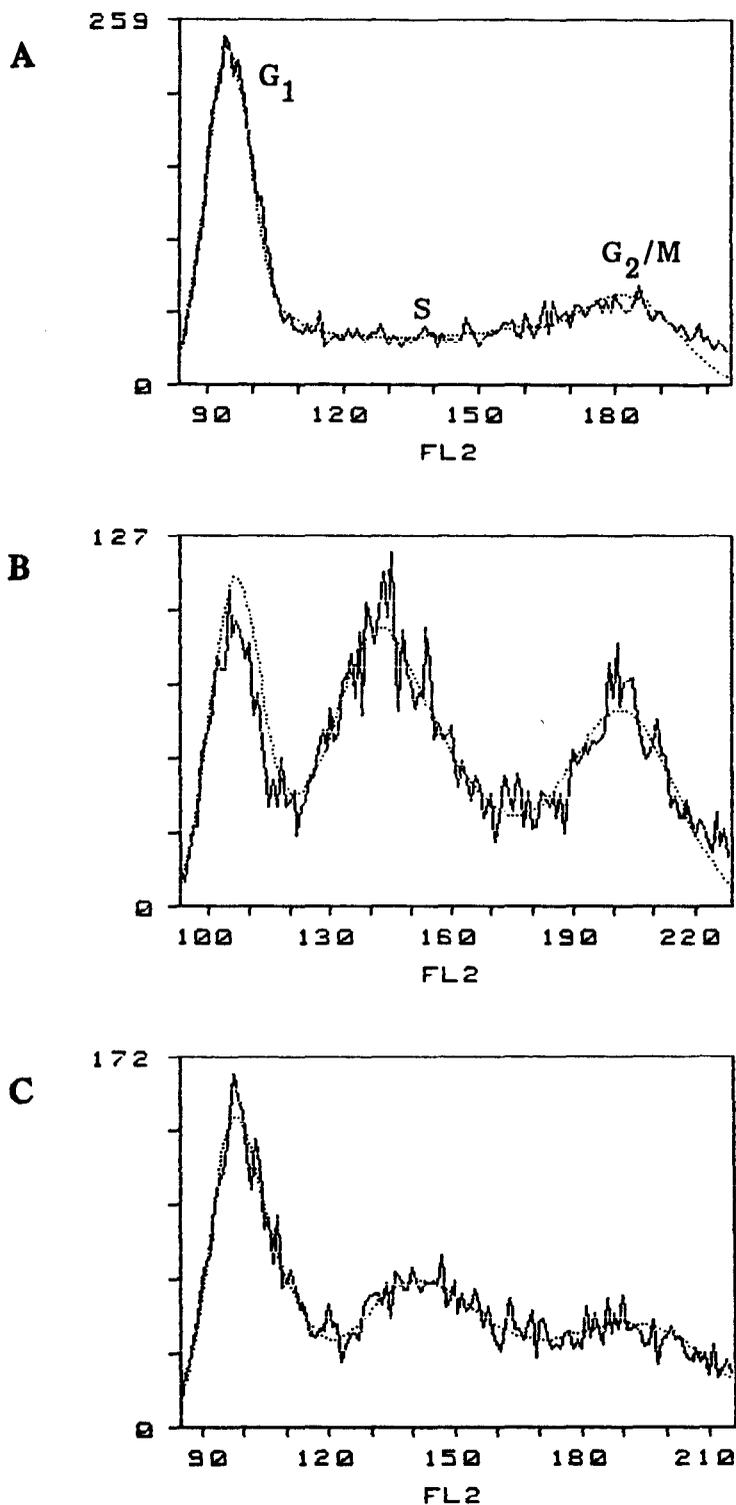


Figure 20 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes NIH 3T3 synchronisés par un double blocage thymidine et remis en culture 4h (B) et 8h (C) comparés à un témoin en phase exponentielle de croissance (A).

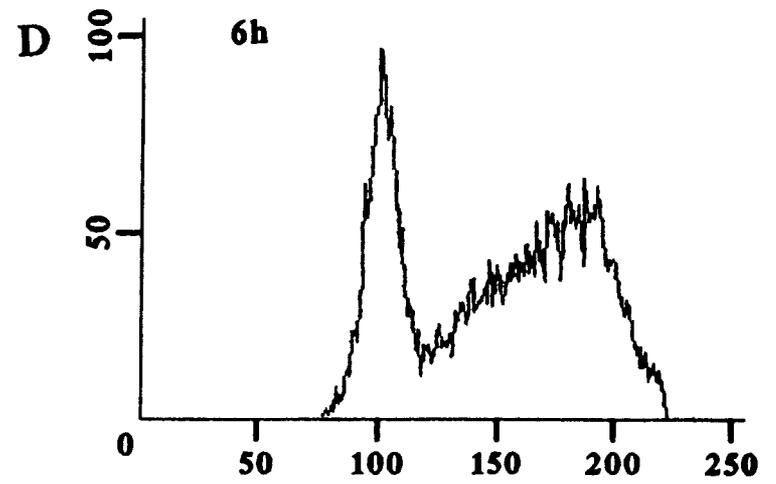
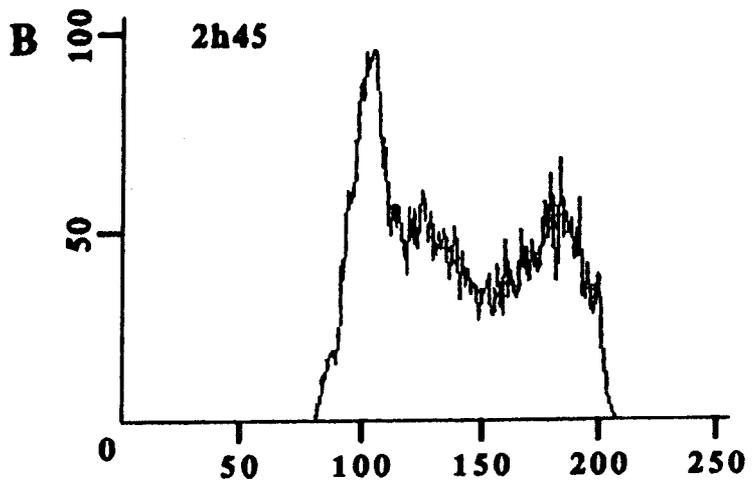
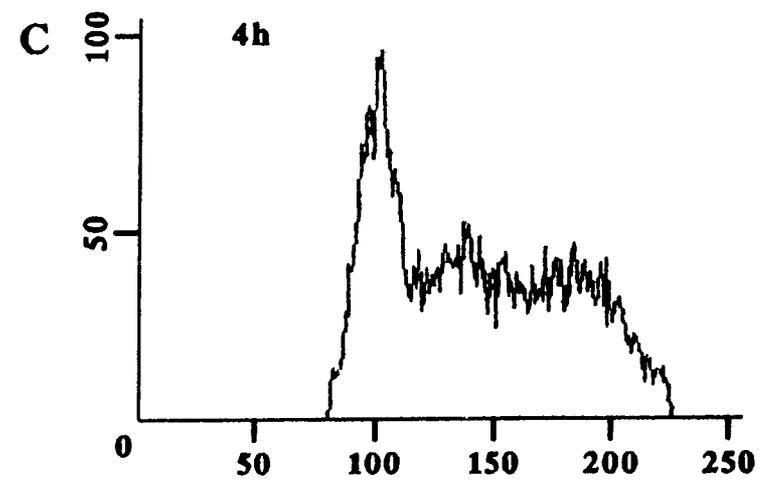
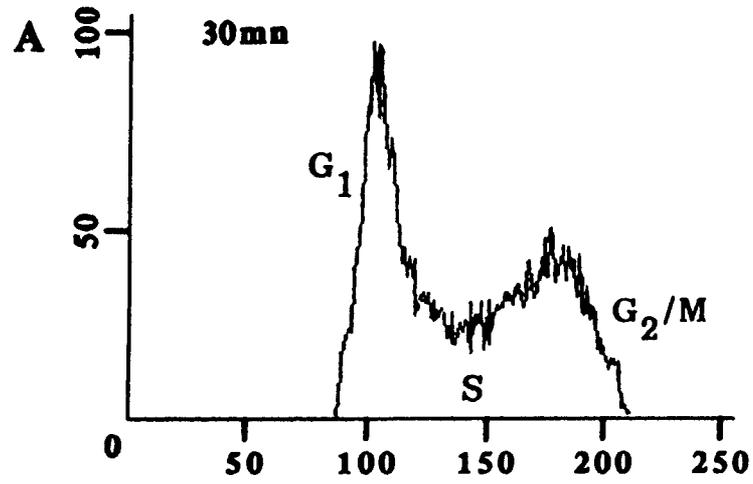


Figure 21 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes NIH transformés par l'oncogène ras, bloqués par la thymidine, remis en culture et prélevés à différents temps : 30mn (A), 2h45 (B), 4h (C), 6h (D).

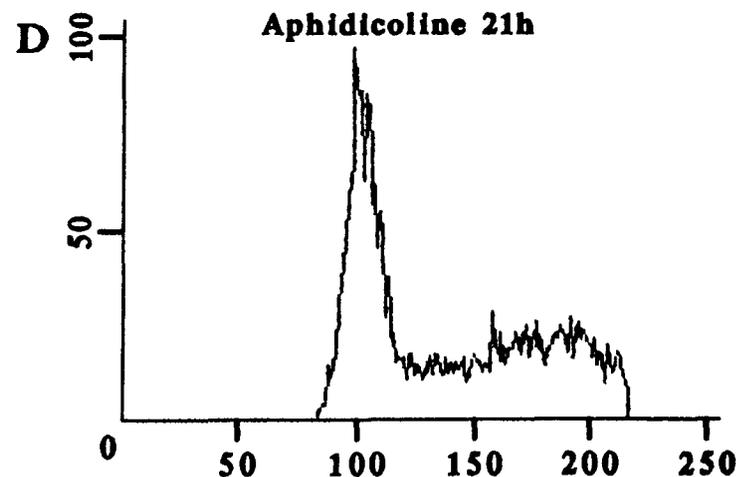
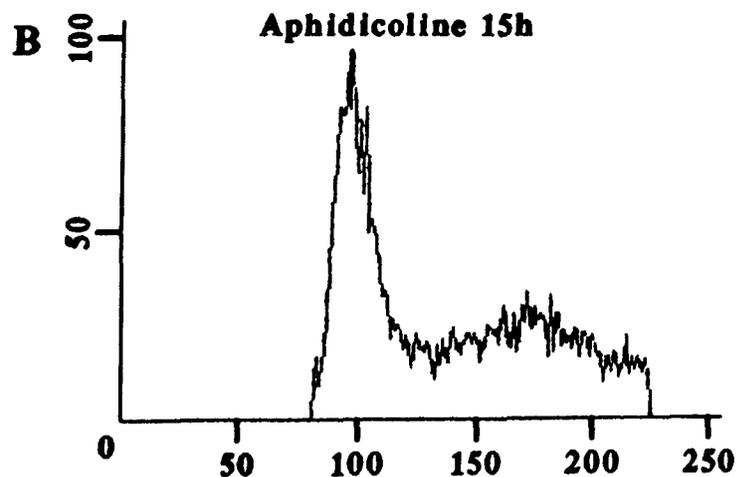
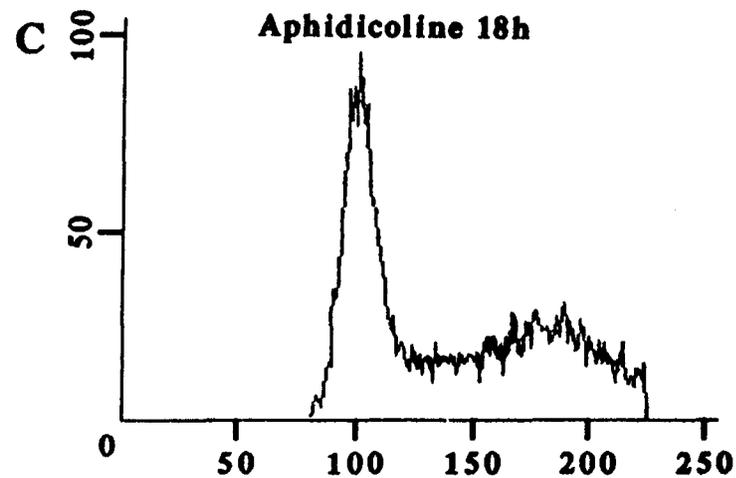
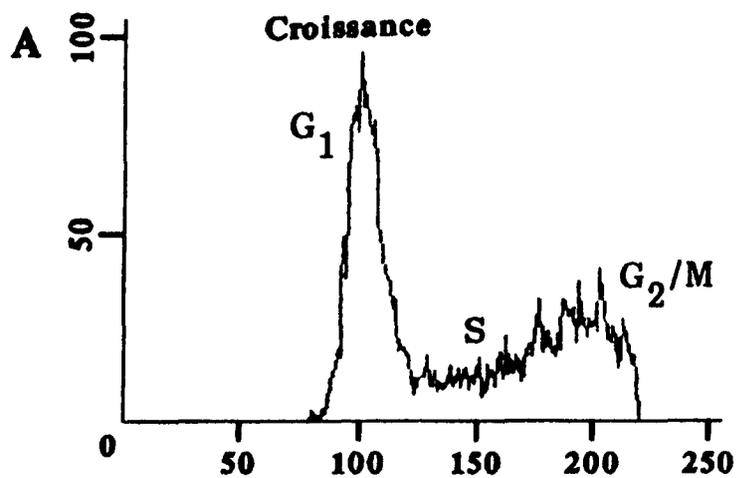


Figure 22 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes NIH 3T3 traités 15h (B), 18h (C) et 21h (D) par de l'aphidicoline 3 μ M comparés à un histogramme des mêmes cellules en phase exponentielle de croissance (A).



II.3.2. Blocages chimiques.

Les méthodes physiques étant inefficaces dans le cas de nos cellules, nous avons étudié les possibilités de blocage par un agent tel que le Hoechst 33342 (bisbenzimidazole, Calbiochem) (Tobey et al., 1990). Cet agent est utilisé après une présynchronisation par un double blocage à la thymidine ; la concentration de bisbenzimidazole utilisée est de 7,5 µg/ml de milieu, des concentrations plus élevées bloquant précocement les cellules en fin de phase S (Fig. 23) ; la durée du blocage est de 24h, une durée plus courte ne permet pas aux cellules d'atteindre la phase G₂.

Les fibroblastes transformés (NIH ras) ont été traités dans les mêmes conditions : la durée optimale d'action du Hoechst est de 24h après une présynchronisation par la thymidine et une remise en culture de 4-5h, des temps plus longs n'apportant pas de meilleurs résultats (Fig. 24).

II.4. Synchronisation en phase mitotique.

S'agissant de la phase la plus courte, les cellules en mitose sont en quantités beaucoup plus réduites par rapport aux autres phases.

II.4.1. Synchronisation par agitation.

Les méthodes physiques d'obtention d'enrichissement en cette phase sont assez délicates. Nous avons ainsi essayé la méthode usuelle par agitation (Terasima et Tolmach, 1962) mais cette dernière s'est avérée inefficace : elle ne fournit qu'une quantité faible de cellules, quantité insuffisante pour les études ultérieures envisagées. De plus elle entraîne la récolte de débris divers et de cellules mortes en suspension dans le milieu.

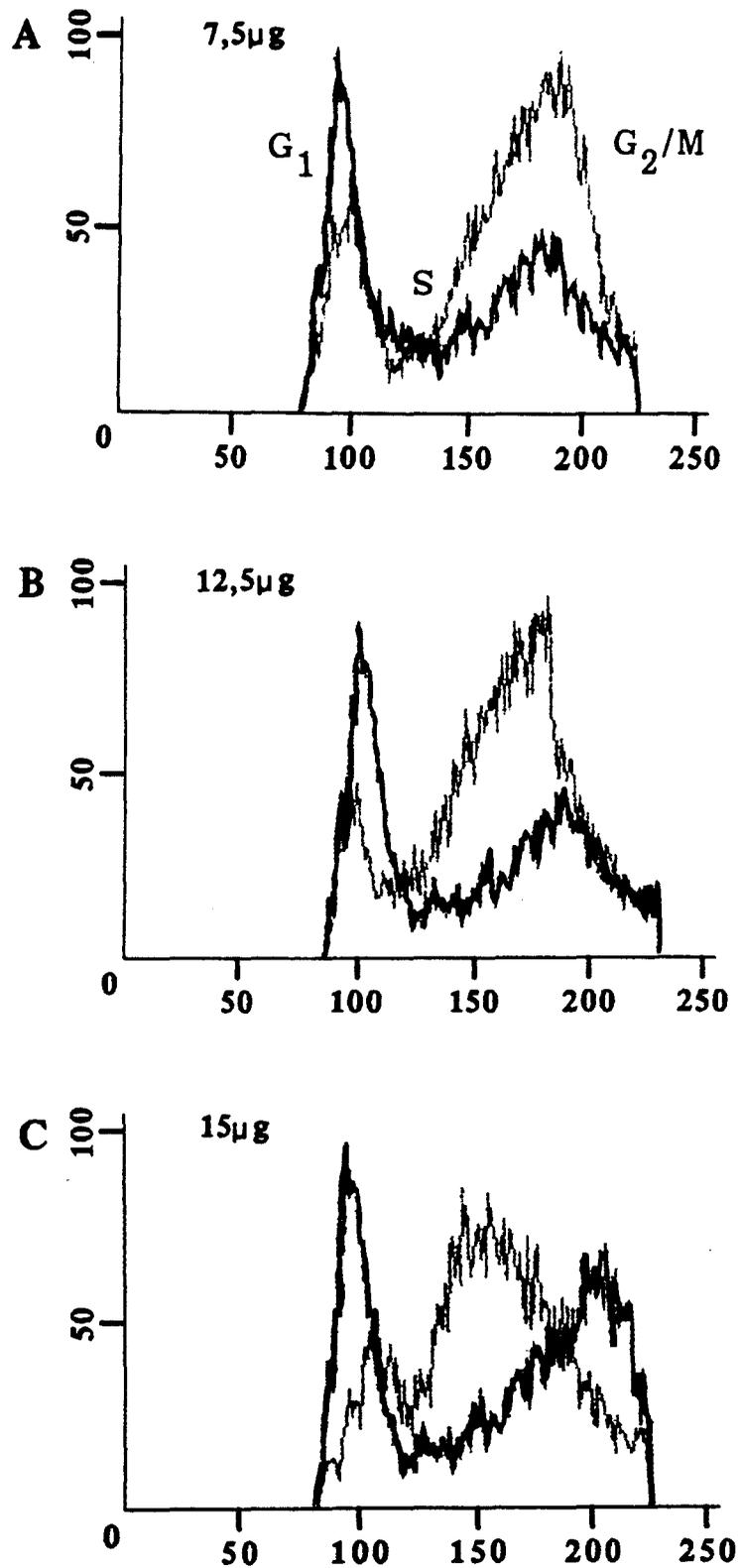


Figure 23 : Histogrammes de fibroblastes NIH 3T3 bloqués par la thymidine puis par du Hoechst 33342 à différentes concentrations : 7,5µg (A), 12,5µg (B), 15µg (C). Ces profils sont comparés à un témoin exponentiel (tracé en gras).

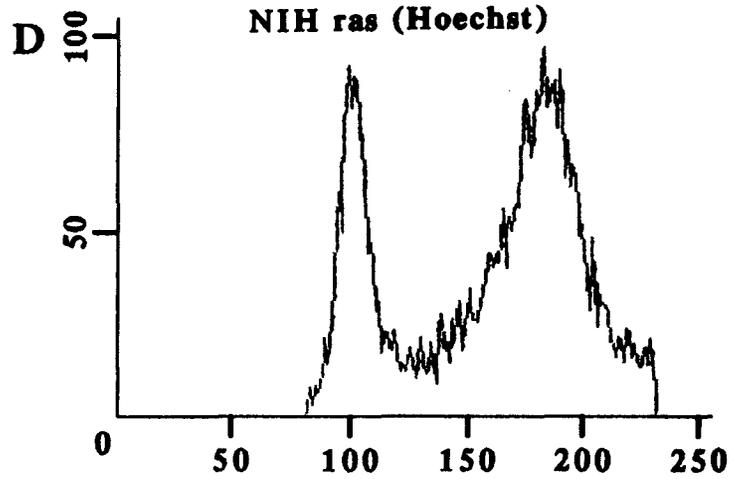
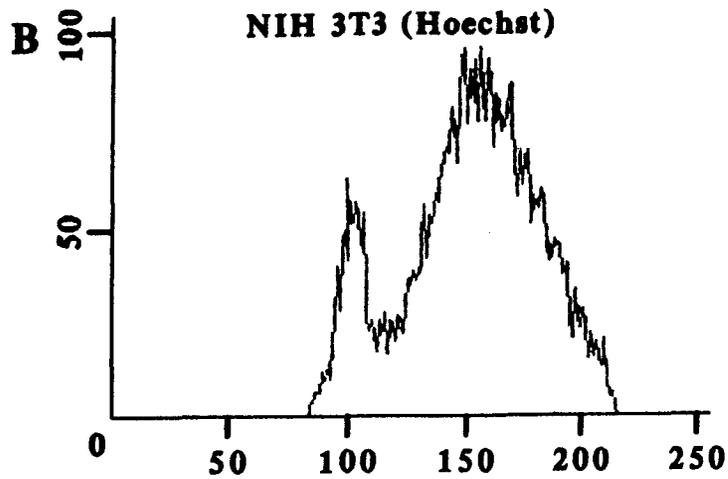
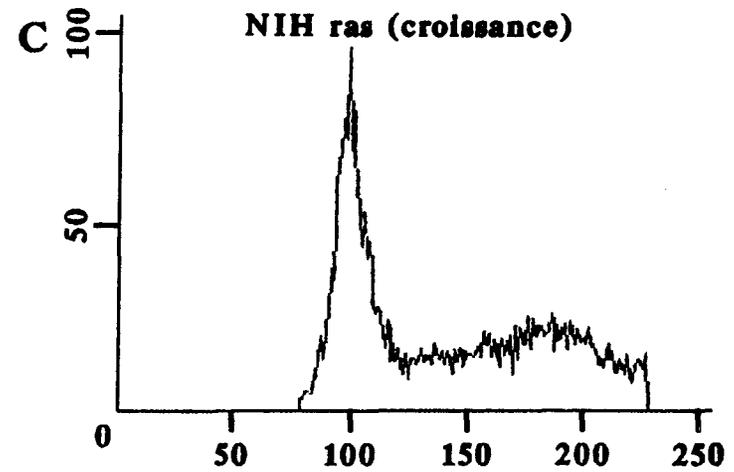
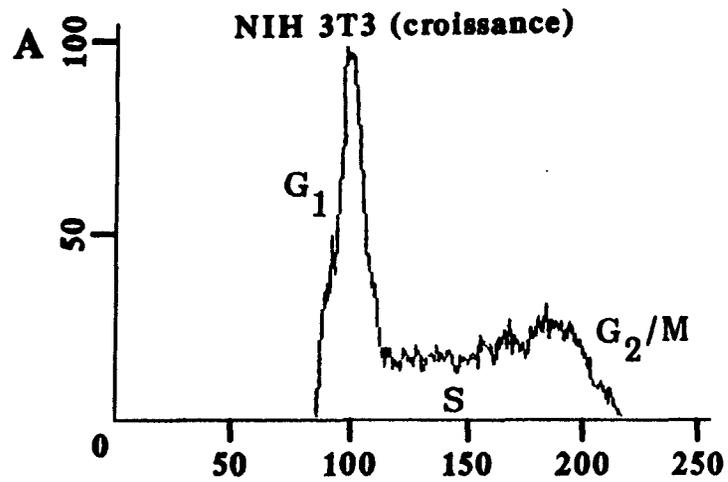


Figure 24 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes NIH 3T3 normaux (A et B) ou transformés par l'oncogène ras (C et D) ; comparées à un témoin en phase exponentielle de croissance (A et C) ces cellules ont été bloquées par de la thymidine puis par le Hoechst 33342 durant 24h (B et D).

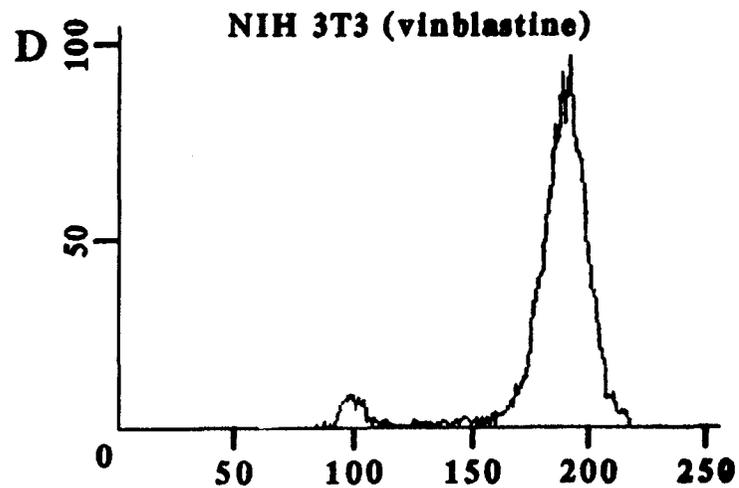
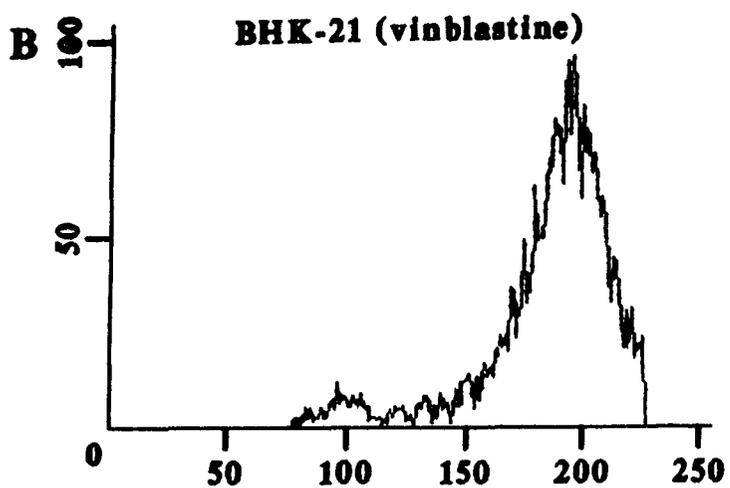
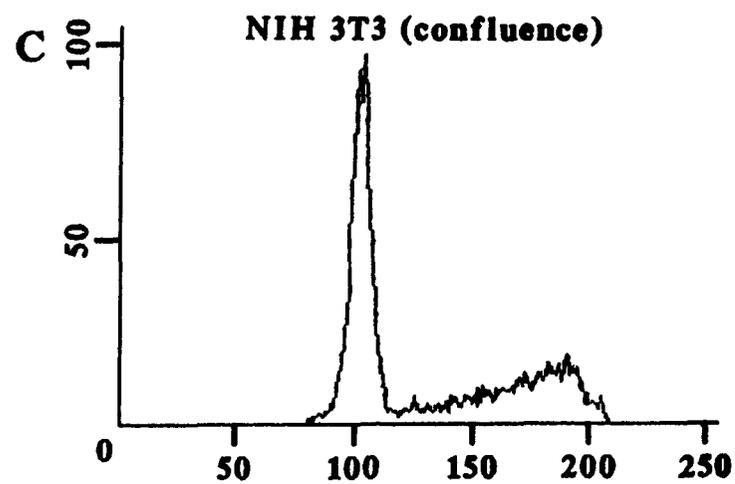
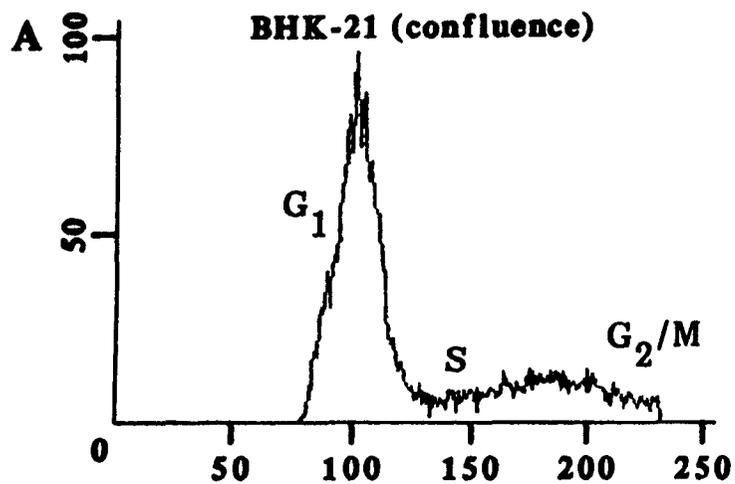


Figure 25 : Histogrammes (FACScan) de fibroblastes BHK-21 (A et B) et NIH 3T3 (C et D) cultivés à confluence (A et C) et en phase exponentielle de croissance bloqués par la vinblastine sulfate (B et D).

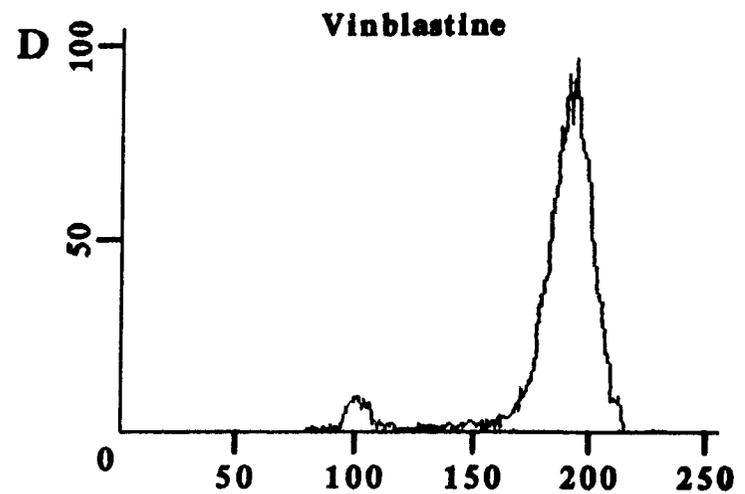
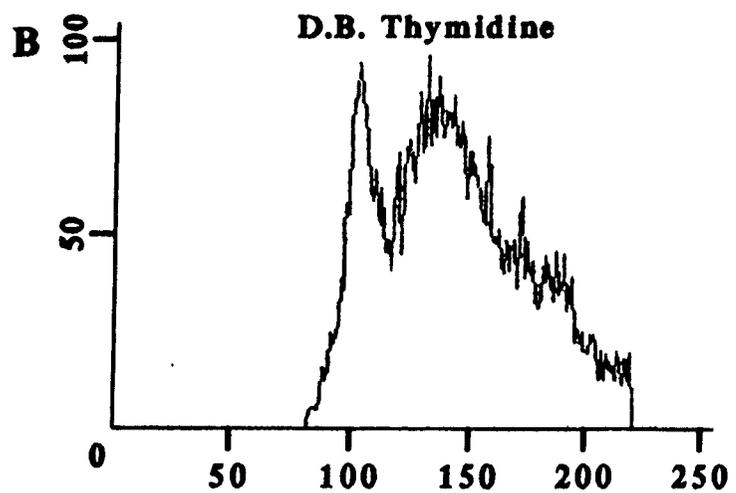
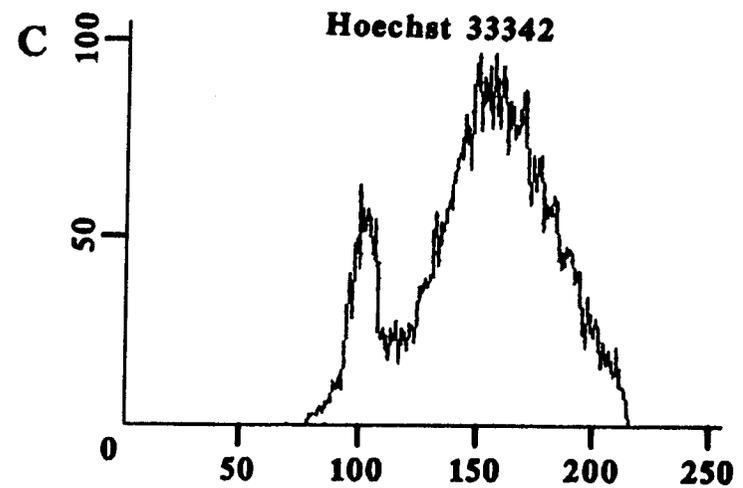
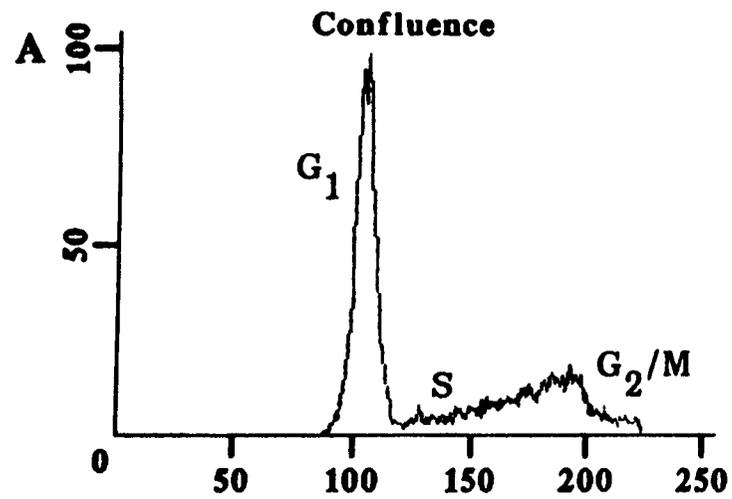


Figure 26 : Histogrammes de fibroblastes NIH 3T3 (FACScan) cultivés à confluence (A), traités par la thymidine (B), traités par la thymidine puis le Hoechst 33342 (C), traités par la vinblastine sulfate (D).

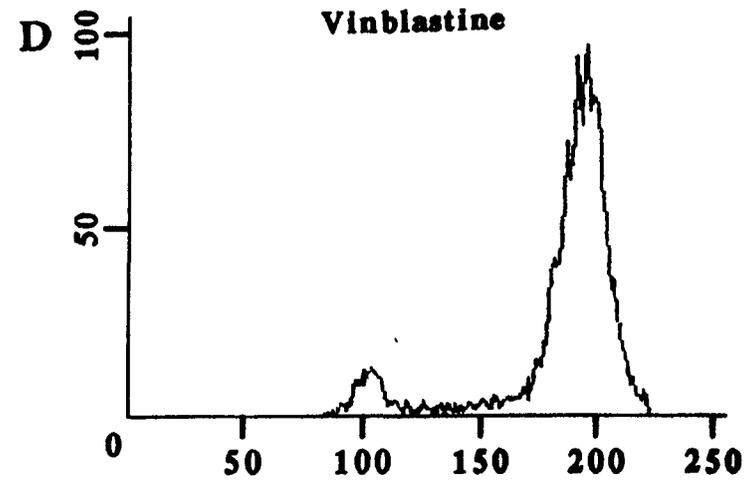
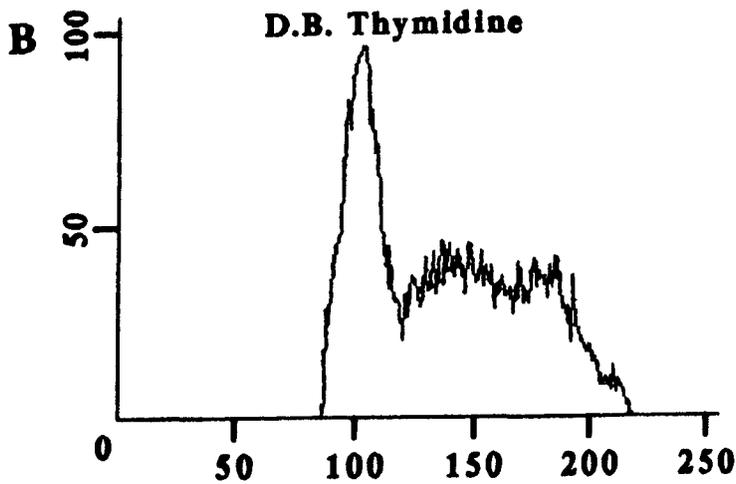
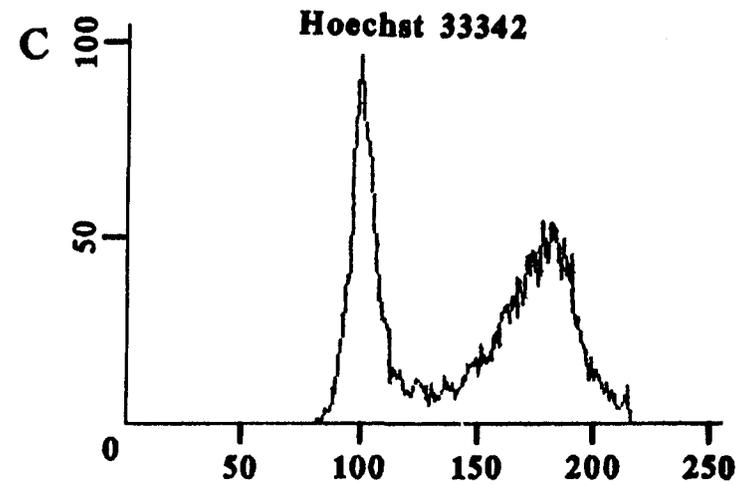
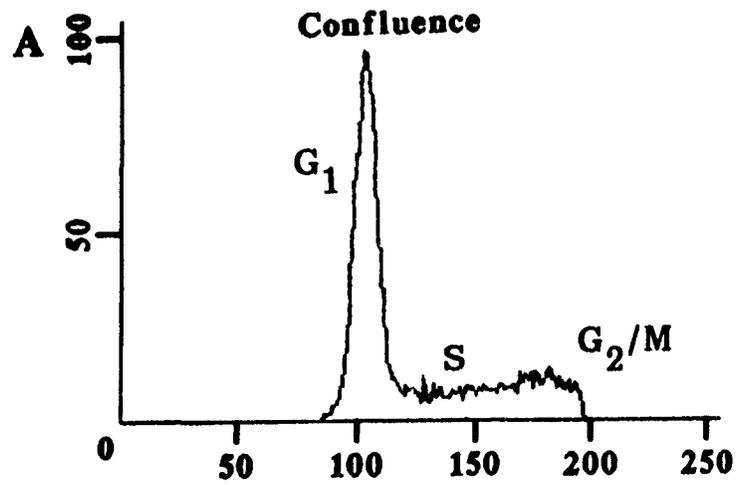


Figure 27 : Histogrammes (FACSscan) de fibroblastes NIH transformés par l'oncogène ras et cultivés à confluence (A), bloqués par la thymidine (B), bloqués par la thymidine puis le Hoechst 33342 (C), bloqués par la vinblastine sulfate (D).

II.4.2. Blocages chimiques.

La méthode précédente étant inapplicable dans notre cas, il s'est donc avéré nécessaire de recourir à des agents bloquants du type colchicine ou vinblastine sulfate. La première, la plus toxique, associée à la méthode d'agitation, n'a pas apporté de résultats spectaculaires dans les conditions utilisées.

Par contre, la sulfo-vinblastine, utilisée à 0,012 $\mu\text{g/ml}$ durant 24h sur des cellules en croissance exponentielle (24h après le repiquage par exemple), bloque la majorité des cellules en mitose (Fig. 25, page 103) sans détérioration apparente ; toutes les cellules d'une boîte de culture peuvent être récoltées par simple pipettage, sans nécessité de récupération par agitation ou à l'aide d'un agent chélateur comme l'EDTA (Robbins et Marcus, 1964).

III. CONCLUSIONS.

Des enrichissements satisfaisants ont été obtenus dans les quatre phases du cycle cellulaire par différentes méthodes de synchronisation (Fig. 26 et 27) et nous ont permis d'entreprendre l'étude de l'apparition éventuelle de différences de glycosylation à la surface de ces cellules en fonction des phases de leur cycle cellulaire. Les résultats des synchronisations effectuées sont résumés par les tableaux VIII et IX.

Il convient cependant de tenir compte de certains détails qui peuvent avoir de l'importance dans l'interprétation des résultats obtenus lors des études des populations glycaniques de surface :

1) La méthode utilisée pour obtenir des cellules dans la première phase du cycle cellulaire ne perturbe pas le métabolisme cellulaire. Elle ne permet cependant pas de séparer les cellules quiescentes (G_0) des cellules en début de croissance (G_1), dont les métabolismes diffèrent assez sensiblement.

2) Les procédés utilisés pour isoler des cellules dans les autres phases du cycle emploient des composés perturbant le métabolisme normal de ces cellules (la thymidine étant cependant un élément perturbateur "naturel" de ce métabolisme) et peuvent donc agir sur le métabolisme des glycoconjugués. Il s'agit là d'un élément dont il faut tenir compte dans l'interprétation de résultats concernant ces phases.

3) Les populations obtenues, plus particulièrement dans le cas des phases S et G_2 , ne sont jamais composées de cellules qui, à 100%, sont dans une phase bien déterminée du cycle (voir tableaux VIII et IX). Si donc de faibles différences apparaissent dans la glycosylation de ces cellules, elles risquent de n'être pas décelables par nos méthodes d'analyse.

Il conviendrait donc ultérieurement d'employer des méthodes, à la fois, moins "chimiques" et plus efficaces pour obtenir des enrichissements plus importants. L'utilisation de la centrifugation par élutriation suivie de l'emploi d'un trieur de cellules est envisagée.

4) Les cellules étudiées sont toutes des fibroblastes et ne peuvent donc représenter tous les types cellulaires. La présence ou l'absence de modifications dans la glycosylation de surface ne concerne donc que ce type cellulaire.

Afin de confirmer les conclusions ultérieures, il est donc souhaitable d'effectuer la même étude sur d'autres types cellulaires.

Tableau VIII : Comparaison de la répartition des fibroblastes BHK-21 et BHK-21/HSV dans les différentes phases du cycle cellulaire dans le cas de leur culture à confluence et de leur blocage par la sulfovinblastine.

		G_0/G_1	S	G_2/M
BHK-21	PLATEAU	68-90%	6-20%	4-14%
	VINBLASTINE	3-9%	3-8%	85-95%
		G_0/G_1	S	G_2/M
HSV	PLATEAU	55-70%	18-30%	10-20%
	VINBLASTINE	10-18%	10-23%	65-80%

Tableau IX : Comparaison de la répartition des fibroblastes NIH 3T3 et NIH ras dans les différentes phases du cycle cellulaire dans le cas de leur culture à confluence (plateau), d'un double blocage par la thymidine suivi d'une remise en culture 4h (thymidine), du traitement précédent suivi d'un blocage par de la bisbenzimidazole 33342 (Hoechst) et d'un blocage par la vinblastine sulfate (vinblastine).

		G_0/G_1	S	G_2/M
NIH 3T3	PLATEAU	65-82%	10-24%	6-15%
	THYMIDINE	10-23%	58-75%	15-22%
	HOECHST	15-25%	34-53%	32-42%
	VINBLASTINE	3-9%	3-7%	85-95%
		G_0/G_1	S	G_2/M
NIH ras	PLATEAU	60-71%	19-27%	10-17%
	THYMIDINE	32-39%	40-55%	20-23%
	HOECHST	32-41%	22-31%	31-46%
	VINBLASTINE	4-15%	14-25%	66-78%

Choix du protocole
de fractionnement.

Mise au point de
l'HPLC d'affinité.

I. REMARQUES GENERALES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR LECTINES.

Une des techniques de séparation de molécules les plus performantes utilisées actuellement est la chromatographie d'affinité (Pazur, 1981) qui exploite les interactions spécifiques et réversibles entre des "couples" biologiques : enzyme/substrat ou inhibiteur, hormone/récepteur, antigène/anticorps, lectines/glycoconjugués.

Lorsque les molécules à fractionner sont glycosylées : glycoprotéines, glycolipides, polysaccharides, glycopeptides ou même cellules intactes, l'emploi des lectines comme ligands s'avère très utile (Debray et Montreuil, 1991). Une méthode très répandue utilise des lectines végétales immobilisées par couplage sur de l'Agarose activé (Lis et Sharon, 1981). Elle donne de très bons résultats lors de fractionnements d'oligosaccharides (Wilchek et al., 1984 ; Merkle et Cummings, 1987).

Les structures glycaniques sont généralement fractionnées en trois groupes distincts sur la plupart des colonnes de lectines immobilisées ; une fraction non retenue, une fraction retardée et une fraction retenue qu'il faudra éluer de la colonne.

I.1. Chromatographie d'affinité conventionnelle et à haute performance.

I.1.1. Remarques générales sur les procédés d'immobilisation.

Lors de l'immobilisation d'une lectine sur un support chromatographique, il faut tenir compte de divers paramètres :

- la taille de la molécule,
- la nécessité de préserver ses structures tertiaire et quaternaire,
- le pH de couplage utilisé doit permettre la conservation de l'intégrité physique et biologique de la lectine,
- l'utilisation d'anions anti-chaotropiques, comme les sulfates et

phosphates, est recommandée pour stabiliser la protéine durant le couplage et augmenter l'interaction avec les groupements actifs de la silice.

D'autre part, l'intérêt de l'activation préalable de la silice a été démontré par l'obtention de meilleurs rendements de couplage (**Nilsson et Mosbach, 1981**).

Enfin, la dimension des pores de la silice est importante et une efficacité optimale du support est obtenue avec des billes de silice dont le diamètre des pores est de 100Å (**Walters, 1982**).

Les recherches que nous avons menées dans le cadre de notre DEA nous ont conduit à comparer plusieurs méthodes d'immobilisation de lectines sur silice et les meilleurs résultats ont été obtenus avec un dérivé de silice-diol (**Ohlson et al., 1978**). Cette méthode consiste à synthétiser une époxysilice par action du 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (**Borchert et al., 1982**). Par traitement acide, les groupements époxy sont réduits en groupements diol. Ces derniers sont ensuite oxydés par l'acide périodique démasquant ainsi des fonctions aldéhydiques réactives (Fig. 27) (**Ohlson et al., 1978 ; Borchert et al., 1982**) sur lesquelles se fixe la lectine par l'intermédiaire des fonctions amine des résidus de lysine.

I.1.2. La chromatographie d'affinité conventionnelle sur lectines immobilisées présente certains inconvénients liés aux propriétés des gels utilisés comme supports :

- Les débits étant limités à quelques ml/h, les temps d'élution sont souvent très longs (heures, jours).

- La faible capacité des colonnes de lectines immobilisées (75µg de

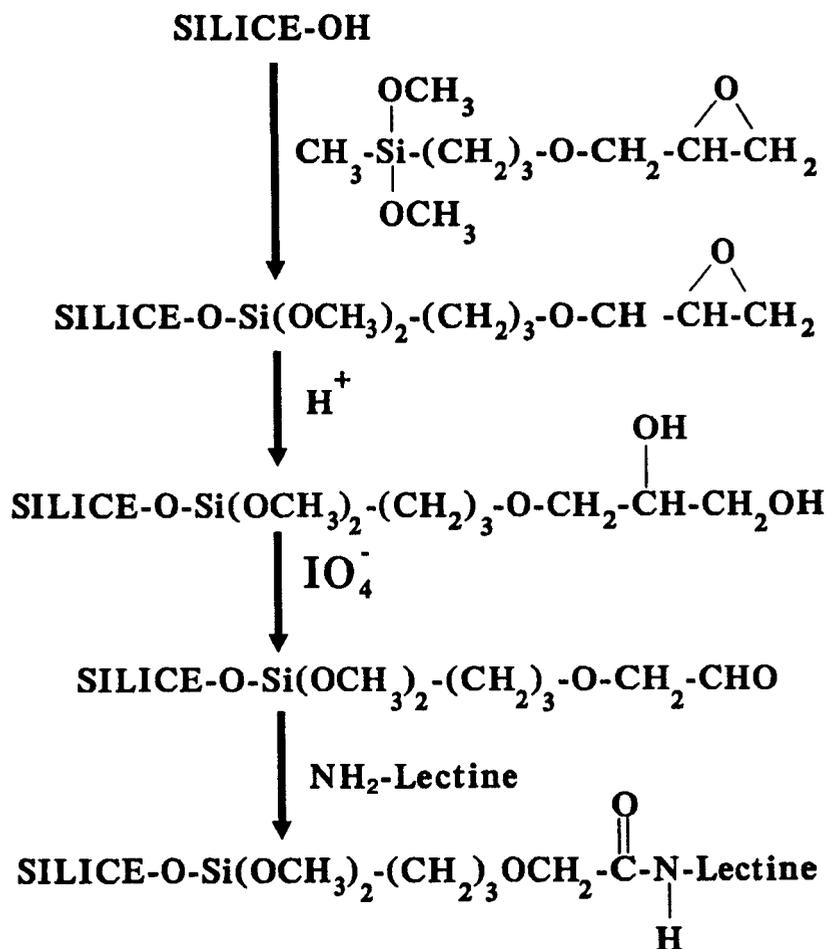


Figure 27 : Réaction de couplage des lectines sur de la silice activée par le 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane.

N-glycosylpeptides biantennés par ml de Con A-Sepharose) nécessite le recyclage de la fraction non retenue.

- L'élution de certaines fractions (fractions fortement retenues sur ConA par exemple) ne peut être réalisée qu'avec des solutions concentrées (0,5M) de monosaccharide reconnu par la lectine. La régénération du support d'affinité nécessite ensuite un rinçage abondant avec le tampon de départ.

- Enfin, la susceptibilité des gels à se contracter ou à gonfler lors des changements de force ionique et de pH peut perturber le fractionnement.

I.1.3. L'introduction récente de **la chromatographie d'affinité de haute performance (HPLAC)** permet d'associer à la rapidité de la chromatographie liquide de haute performance la grande spécificité de la chromatographie d'affinité.

Les immunoglobulines A sériques ont ainsi été purifiées sur une colonne de jacaline (**Hon Chui et al., 1990**). Des protéines comme les lectines (ConA, WGA et lectines de graine de Ricin) ont été isolées après fixation sur des monosaccharides ou sur des oligosaccharides immobilisés sur silice (**Honda et al., 1988 ; Abe et Ishii, 1990 ; Kakehi et al., 1990**). Enfin, des mélanges de sucres (**Borrebaeck et al., 1984**), de glycanes (**Green et al., 1987**), ainsi que des glycoprotéines sériques (**El Rassi et al., 1988**) ou membranaires (**Renauer et al., 1985**), ont été fractionnés sur des colonnes de lectines immobilisées sur silice.

Grâce à cette technique, nous pouvions espérer obtenir une meilleure résolution associée à des débits plus élevés lors d'un fractionnement de glycanes d'origine membranaire. Nous avons donc décidé de l'appliquer à notre protocole de fractionnement des glycopeptides membranaires de cellules synchronisées en différentes phases du cycle cellulaire.

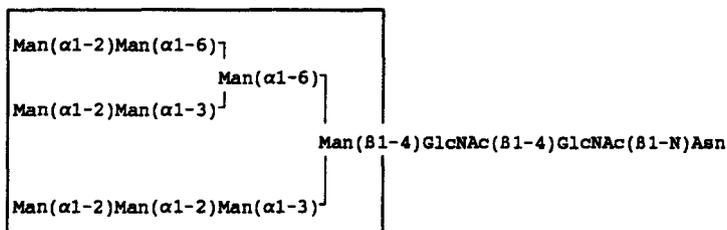
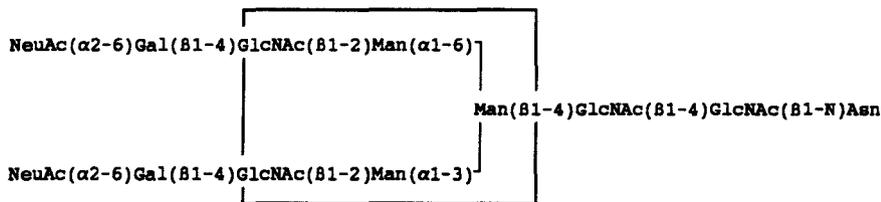
Dans un premier temps, nous avons comparé le pouvoir résolutif de trois lectines de spécificité connue ; la Concanavaleine A (ConA), la lectine de graine de Lentille (LCA) et la lectine d'écorce de Sureau (SNA-I), immobilisées sur Sepharose avec celui des mêmes lectines immobilisées sur silice.

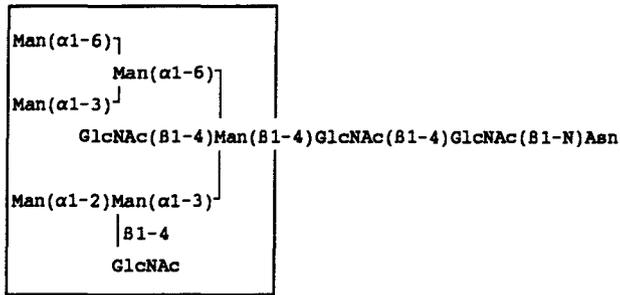
I.2. Les lectines utilisées et leurs performances.

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine animale ou végétale présentant une sélectivité vis-à-vis des sucres simples ou des séquences oligosaccharidiques plus complexes qu'elles reconnaissent (Nicolson, 1974 ; Lis et Sharon, 1973 et 1977 ; Goldstein et Hayes, 1978). Disponibles en grandes quantités, elles constituent donc des ligands d'affinité de choix pour la purification de molécules glycosylées d'origines diverses, ainsi que de cellules.

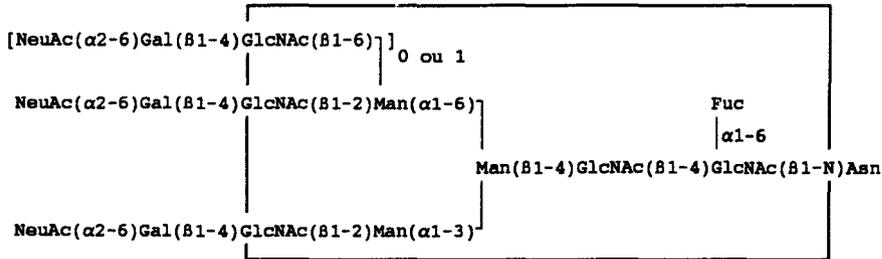
L'affinité des lectines est plus forte pour des structures complexes (10^6M) que pour des monosaccharides (10^4M). Cependant, la plupart des lectines ayant des spécificités identiques vis à vis de sucres simples présentent souvent des spécificités différentes envers des séquences oligosaccharidiques plus complexes (Debray et al., 1981). Par exemple, la Concanavaline A (Con A) et la lectine de graine de lentille (LCA), deux des lectines utilisées dans notre travail, reconnaissent le mannose et le glucose mais présentent des spécificités différentes envers les structures glycaniques suivantes (Debray et al., 1981 ; Kornfeld et al., 1981) :

Con A





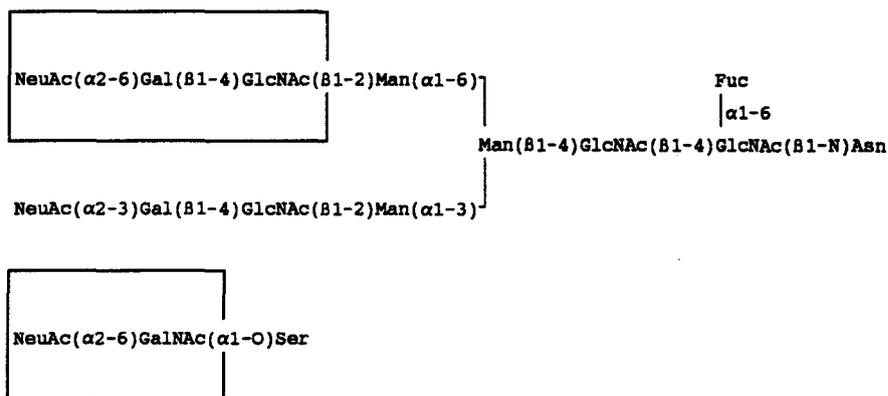
LCA



Il est à noter que le glycanne n'est reconnu par la LCA que s'il est porté par une séquence peptidique. La lectine ne reconnaît donc pas les glycannes libérés par hydrazinolyse (Yamamoto et al., 1982 ; Debray et Montreuil, 1983).

La troisième lectine que nous utiliserons dans ce travail est la SNA (Sambucus nigra agglutinin), spécifique des chaînes de type N-acétyllactosaminique se terminant par un résidu d'acide N-acétylneuraminique lié sur le carbone 6 du galactose terminal (Shibuya et al., 1987) :

SNA-I



La plupart des lectines sont classées suivant leur affinité pour les sucres simples (AAA pour le fucose ; ConA et LCA pour l' α -glucose et l' α -mannose ; RCA, PNA et GSA_I pour le β -galactose ; WGA et GSA_{II} pour la N-acétyl- β -glucosamine ; SNA et MAA pour les acides sialiques).

Trois fractions peuvent être obtenues avec la Concanavalline A immobilisée sur Sepharose 4b (Fig. 28) :

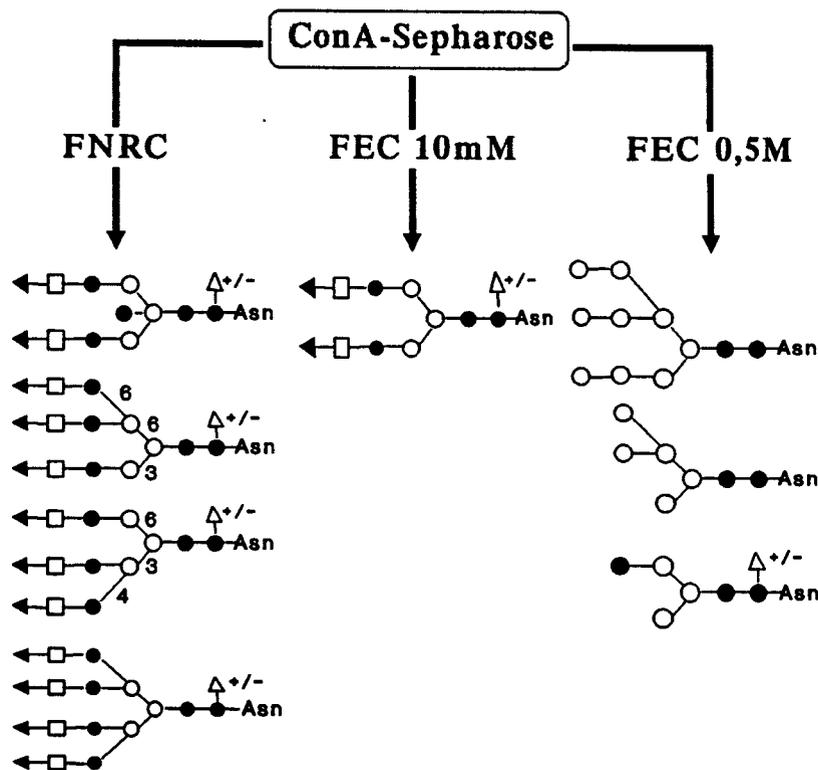


Figure 28 : Schéma de fractionnement d'un mélange de glyco-asparagines sur la Concanavalline A immobilisée sur Sepharose 4B. Trois fractions sont obtenues : une fraction non retenue (FNRC), une fraction retenue et éluee par une solution de -D-méthylglucoside 10mM (FEC 10mM) et une fraction fortement retenue et éluee par une solution de α -D-méthylglucoside 0,5M (FEC 0,5M).

- une fraction non-retendue (FNRC), comprenant des structures de type N-acétyllactosaminique tri-, tri'-, tétraantennées et biantennées à N-acétylglucosamine intercalaire,
- une fraction éluée par une solution d' α -méthylglucoside 10mM (FEC 10mM) contenant les structures de type N-acétyllactosaminique biantennées,
- une fraction éluée par une solution d' α -méthylglucoside 0,5M (FEC 0,5M) contenant principalement les structures oligomannosidiques, ainsi que des structures de type N-acétyllactosaminique biantennées non galactosylées.

Chaque famille obtenue après passage sur ConA-Sepharose été sous-fractionnée sur colonne de LCA-Sepharose (Fig. 29) :

- la fraction non retenue sur Concananvaline A a été sous-fractionnée en deux : une fraction retenue et éluée par une solution d' α -méthylglucoside 0,15M contenant les structures tri'-antennés en β -(1,6), ainsi que les structures biantennées avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire, fucosylées sur l'osamine du point d'attache, et une fraction non retenue contenant les autres structures.
- la fraction FEC 10mM donne également deux fractions dont l'une contient des structures fucosylées en α -1,6 sur leur osamine du point d'attache.
- Enfin, dans la fraction fortement retenue sur ConA (FEC 0,5M), seules les structures fucosylées non galactosylées seront retenues par la LCA (Debray et Montreuil, 1983 ; Montreuil et al., 1983).

Quant à la lectine d'écorce de Sureau SNA-I, elle ne reconnaît parmi ces familles de type N-acétyllactosaminique que les glycanes sialylées en α -2,6 des résidus de galactose en position terminale non-réductrice (Fig. 30) (Shibuya et al., 1987).

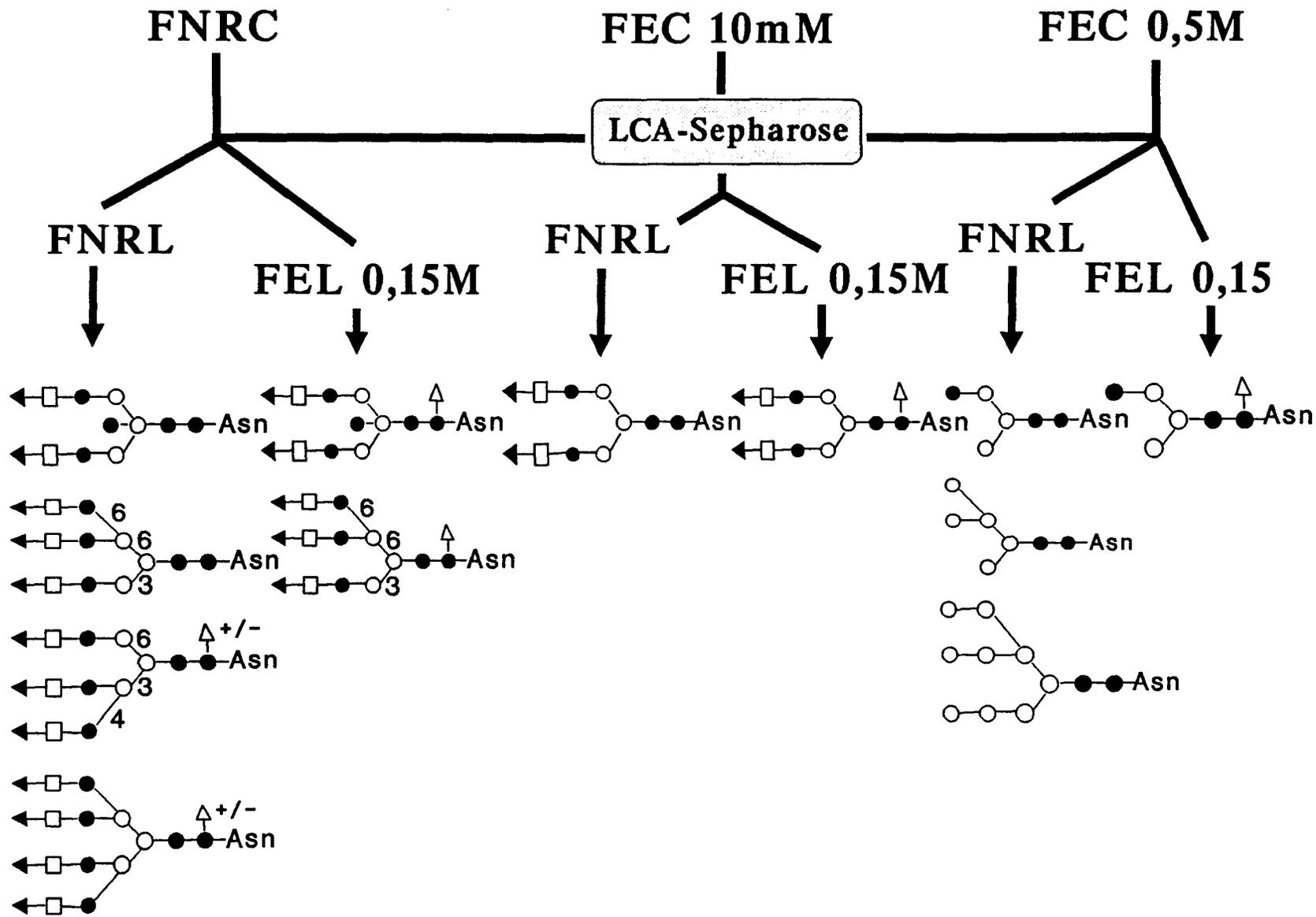


Figure 29 : Schéma de fractionnement sur LCA-Sepharose des populations glycaniques obtenues à partir d'une première séparation sur Con A-Sepharose. Chaque famille donne deux nouvelles fractions : une fraction non retenue (FNRL) et une fraction éluée par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,15M (FEL 0,15M).

* 117 *

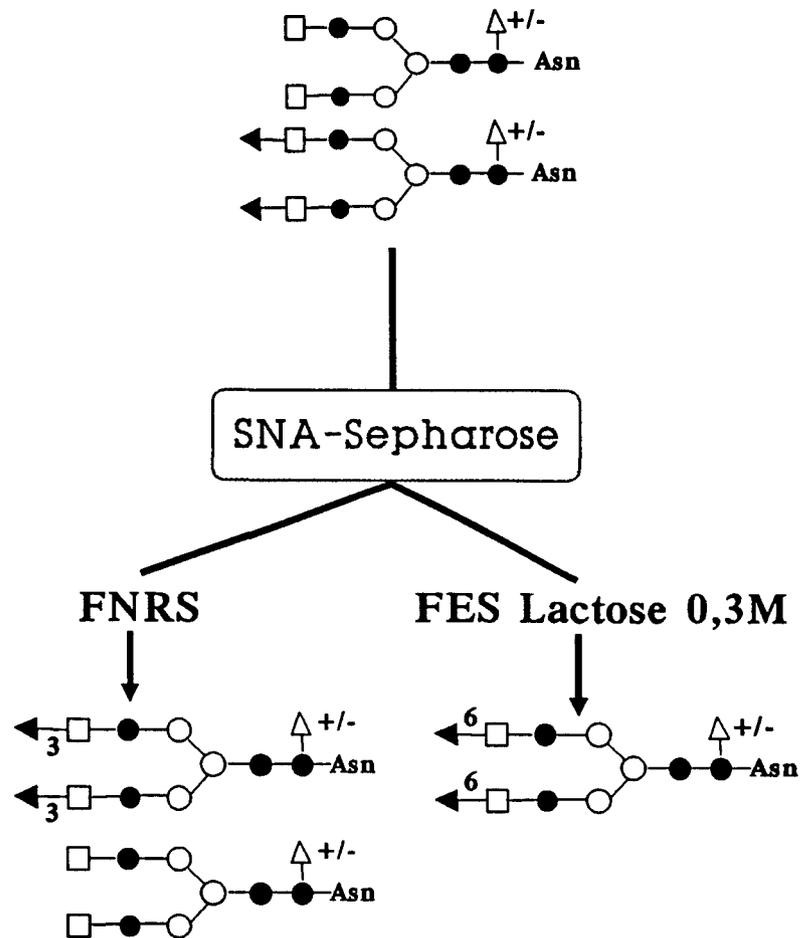


Figure 30 : Schéma de fractionnement sur SNA-Sepharose de structures glycaniques biantennées. Deux fractions sont obtenues : une fraction non-retenue (FNRS) et une fraction éluée par une solution de lactose 0,3M (FES Lactose 0,3M) renfermant les structures sialylées en α -(2,6).

Notre but était donc de transposer ce schéma de fractionnement en utilisant une chromatographie liquide de haute performance d'affinité séquentielle sur Con A, LCA et SNA-I immobilisées sur un support de silice.

II. MATERIEL

II.1. Appareils

Nous utilisons une pompe HPLC isocratique Shimadzu LC-6A, des colonnes en acier inoxydable (Science Tec) de 10cm de long et de

0.46cm de diamètre dont le remplissage est effectué avec le support de chromatographie sous une pression de 450 bars.

II.2. Réactifs

La silice utilisée est le Lichrosorb SI 100 (5 μ m) (Merck). Le 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane provient de chez Aldrich.

II.3. Lectines

La Concanavaline A est achetée chez IBF. Les lectines de graine de Lentille (LCA) et d'écorce de Sureau (SNA-I) sont préparées au laboratoire par chromatographie d'affinité sur Sephadex G100 pour la première, selon la méthode de Toyoshima et al. (1970) et sur fétuine-Sepharose 4B, pour la seconde (Broekaert et al., 1984). La pureté de chaque lectine est préalablement contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) et leur activité est vérifiée par détermination de leur pouvoir agglutinant envers des hématies de Lapin, par la méthode de double dilution sur plaque de microtitration.

II.4. Tampons d'équilibrage des colonnes

Pour la LCA et la SNA-I, le tampon utilisé est le PBS (pH 7,2 ; NaCl 155mM ; Na₂HPO₄ 7,5mM ; NaH₂PO₄ (2H₂O) 3,6mM ; NaN₃ 0,2%).

Pour la Con A, le tampon est une solution d'acétate à pH 5,2 ; Acétate de sodium 5mM ; NaCl 0,1M ; MgCl₂ 1mM ; MnCl₂ 1mM ; CaCl₂ 1mM ; NaN₃ 2%).

III. TECHNIQUES UTILISEES.

III.1. Origine des glycopeptides témoins

Les glycopeptides à structures glycaniques de type N-acétyllactosaminique ou oligomannosidique (Tableaux X à XII) ont été préparés par hydrolyse pronasique des glycoprotéines suivantes : lactotransferrine humaine, fibrinogène bovin, thyroglobuline bovine et lectine de Soja, selon la méthode de Muramatsu (**Muramatsu et al., 1973**). Les glycopeptides ont ensuite été fractionnés sur colonne de Concanavaline A-Sepharose (**Montreuil et al., 1986**) :

- les glycopeptides de thyroglobuline bovine non-retenus sur ConA-Sepharose renferment des structures de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés.

- les glycopeptides de lactotransferrine humaine ou de fibrinogène bovin, faiblement retenus sur ConA-Sepharose et élués par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,01M renferment les structures glycaniques de type N-acétyllactosaminique biantennés.

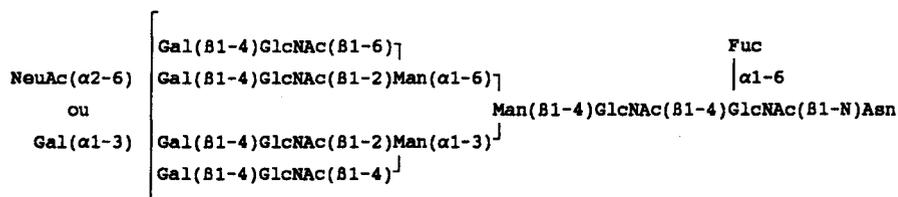
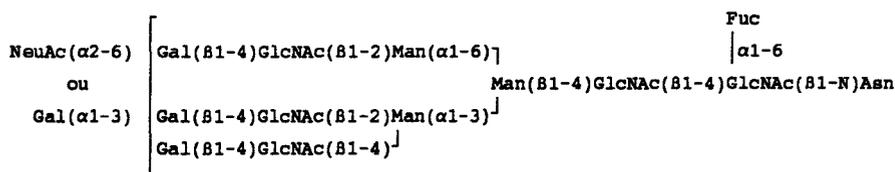
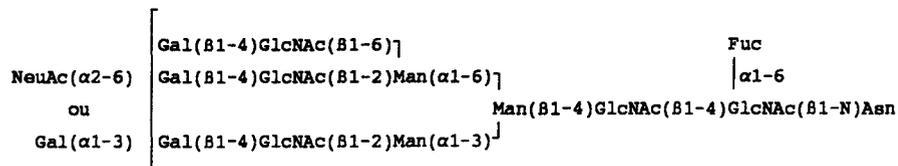
- les glycopeptides de lectine de soja, fortement retenus sur conA-Sepharose et élués par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,5M, renferment des structures de type oligomannosidique à 9 résidus de mannose.

- les compositions en sucres et les rapports molaires de ces structures ont été déterminés par microméthanolyse (**Kamerling et al., 1975**) et par chromatographie en phase gazeuse. Certaines structures ont été établies par résonance magnétique nucléaire du proton à 400MHz.

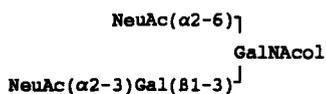
La structure de type oligomannosidique à 5 résidus de mannose (Tableau XI, structure 6) a été préparée par J.F. Haeuw, par action d' α -mannosidases sur une structure à 9 résidus de mannose.

TABLEAU XII : Glycopeptides de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennés de thyroglobuline bovine obtenues par hydrolyse pronasique et disialyloligosaccharide-alditol de fétuine.

Structures 9 : STRUCTURES GLYCANNIQUES TRI- ET TETRAANTENNEES DE THYROGLOBULINE BOVINE (MELANGE)



Structure 10 : DISIALYLOLIGOSACCHARIDE-ALDITOL DE FETUINE.



Les structures de type hybride d'ovalbumine (Tableau X, structure 4 et Tableau XI, structures 7 et 8) nous ont été fournies par G. Strecker.

Tous ces glycopeptides ont été N-acétylés avec de l'anhydride acétique ^{14}C selon le protocole de Koide et Muramatsu (1974) et, après purification, leur radioactivité spécifique a été établie.

Le disialyl-oligosaccharide-alditol (Tableau XII, structure 10) a été préparé à partir de la fétuine, par β élimination dans les conditions de Lyer et Carlson (1971) et fractionnement sur Biogel P4. Après désacétylation obtenue par l'hydrazine anhydre pendant 12h à 105°C, l'oligosaccharide-alditol a été ensuite N-réacétylé avec de l'anhydride acétique ^{14}C et, après purification, sa radioactivité spécifique établie.

III.2. Immobilisation des lectines sur silice

III.2.1. Préparation d'une silice-diols

4g de silice sont suspendus dans 40ml d'acétate de sodium 0,1M (pH 5,5) et dégazés sous vide dans un bain ultrasonique. 2,5ml de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane sont alors ajoutés. La suspension est chauffée à 90°C sous agitation durant 5h. La silice est lavée sur verre fritté avec de l'eau, puis avec de l'eau dont le pH est ajusté à 3 avec de l'acide sulfurique. Les groupements époxy formés sont hydrolysés en chauffant à reflux durant 1h dans 200ml d'eau à pH 3. La silice est à nouveau lavée, puis séchée à 70°C durant une nuit.

III.2.2. Détermination de la quantité de diols fixée

Elle s'effectue par oxydation périodique, puis dosage au thiosulfate (Walters, 1985). Un échantillon contenant 1 à 8 μmol de diols est suspendu dans 0,5ml d'acide périodique 0,02M (0,25g HIO_4 , 2 H_2O dans 50ml d'acide acétique à 80%). Le tout est dégazé sous vide dans un bain à ultrasons afin d'éliminer l'air des pores de la silice. On laisse réagir à température ambiante durant 30mn en resuspendant la silice de temps en temps. On ajoute 0,25ml de solution d'iodure de potassium à 10% (p/v) dans de l'eau et on titre avec une solution de thiosulfate (4,9g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 5 H_2O + 0,04g Na_2CO_3 dans 1l d'eau) jusqu'à disparition de la dernière trace de coloration jaune. Une solution témoin ne contenant que

l'acide periodique et l'iodure de potassium est également titrée. La quantité de diol couplée est alors déterminée par la formule suivante :

$$(\text{ml blanc} - \text{ml échantillon}) \times M_{\text{thiosulfate}} \times 500$$

Nous avons couplé 593 μ mol de diol par gramme de silice.

III.2.3. Oxydation de la fonction diol

Elle est obtenue par incubation dans 80ml d'acide acétique (à 90% dans de l'eau) contenant 3g de métaperiodate de sodium, durant 2h à température ambiante. Après une sédimentation à 1000g, la silice-aldéhyde est lavée cinq fois par 50ml d'eau et est resuspendue dans 8ml de phosphate de sodium (0,1M ; pH 5), puis soumise aux ultra-sons pendant 5mn.

III.2.4. Immobilisation des lectines

100mg de lectine sont dissous dans 50ml de phosphate de sodium 0,1M (contenant 0,1M en glucose dans le cas de la Con A et de la LCA ou 0,1M en lactose dans le cas de la SNA-I pour protéger leurs sites de reconnaissance). 12,5mg de cyanoborohydrure de sodium dans 250 μ l du même tampon phosphate sont ensuite ajoutés, le tout étant incubé une nuit à 4°C sous agitation. L'incubation se termine par l'addition de 20mg de borohydrure de sodium, 30mn à température ambiante. La silice est finalement lavée avec du PBS ou le tampon acétate (pour la Con A). La quantité de lectine immobilisée est estimée par mesure à 280nm de la solution de lectine avant couplage et du filtrat récupéré après immobilisation.

Nous avons fixé environ 47mg de Con A, 47,5mg de LCA et 30mg de SNA par gramme de silice.

IV. FRACTIONNEMENTS SUR CONCAVALINE A

IV.1. Résultats.

Les performances d'une colonne de Concanavaline A immobilisée sur silice sont comparées à celles d'une colonne conventionnelle de Concanavaline A immobilisée sur Sepharose 4b (Pharmacia, France). La colonne de silice a une longueur de 10cm et un diamètre de 0,46cm et contient environ 62mg de lectine immobilisée. La colonne de ConA-Sepharose a une longueur de 8,5cm et un diamètre de 1,2cm et contient environ 100mg (10mg/ml) de ConA immobilisée.

Il nous fallait dans un premier temps définir les conditions de débits compatibles avec une bonne interaction entre la lectine immobilisée et les structures glycaniques. Un essai d'injection et d'élution de structures biantennées (Structures 1) à un débit de 1ml/mn sur la colonne de ConA-silice donne un profil de même aspect que celui décrit par Green (Green et al., 1987) (Fig. 32A). Par contre, si l'injection est réalisée à un débit plus faible (0,1ml/mn), la lectine, malgré sa faible affinité envers ces structures glycaniques, peut les reconnaître et les fixer (Fig. 32B). Ces structures seront ensuite éluées à un débit plus élevé (1ml/mn) par le tampon renfermant l' α -D-méthylglucoside 10mM.

Quant aux structures oligomannosidiques à 9 mannoses (Structure 5), elles sont fortement retenues par la ConA (Fig. 33) et ne nécessitent pas de conditions spéciales d'injection.

Nous avons ensuite comparé les performances d'une colonne de ConA immobilisée sur silice à celles d'une colonne de ConA immobilisée

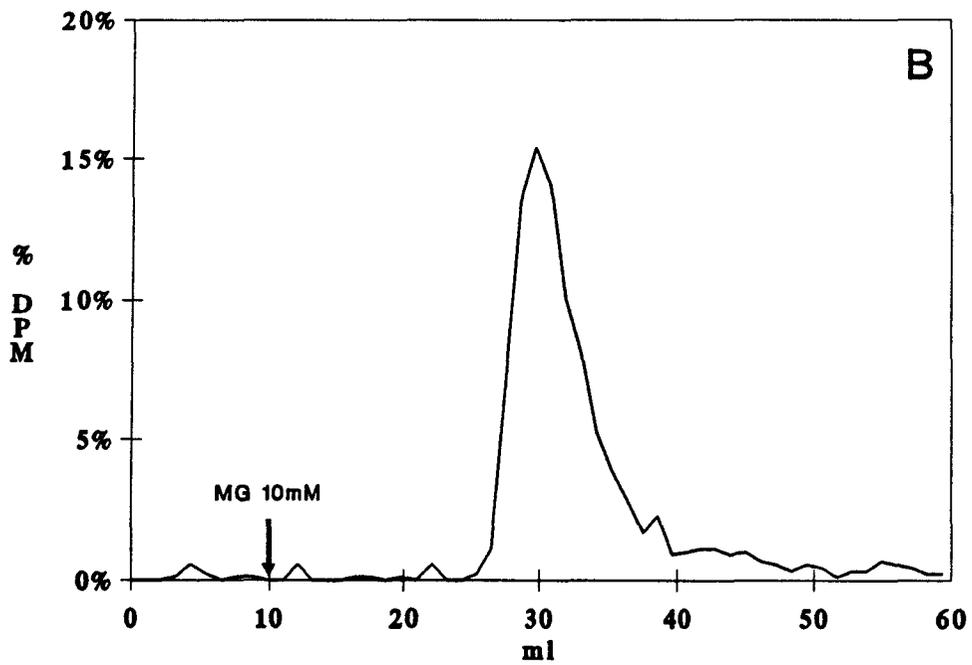
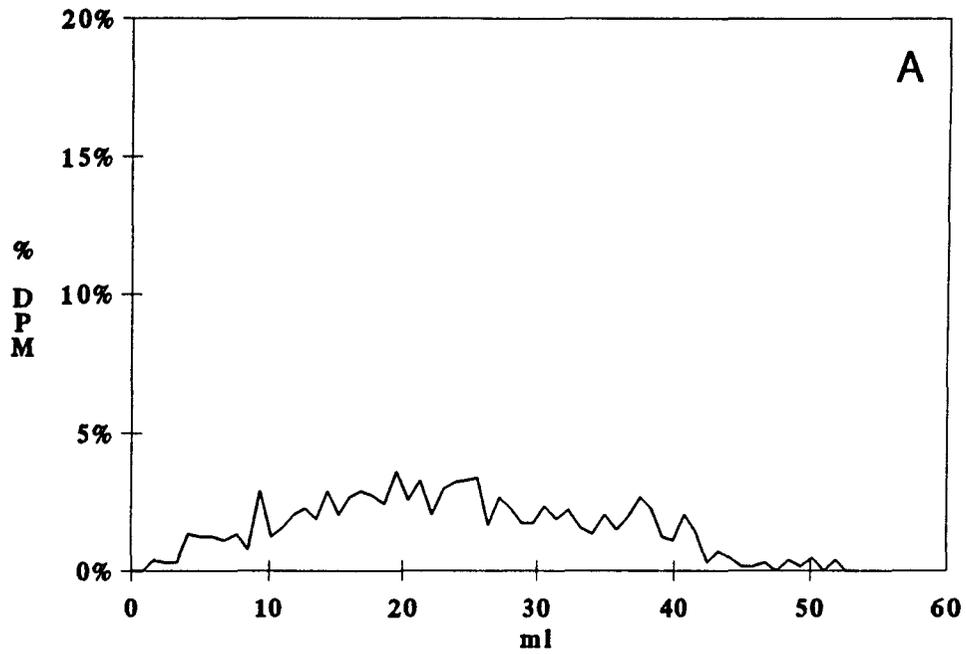


Figure 32 : Profils d'élution de structures biantennées (Structures 1) sur colonne de ConA-silice.

A. Injection et élution à 1ml/mn

B. Injection à 0,1ml/mn et élution à 1ml/mn.

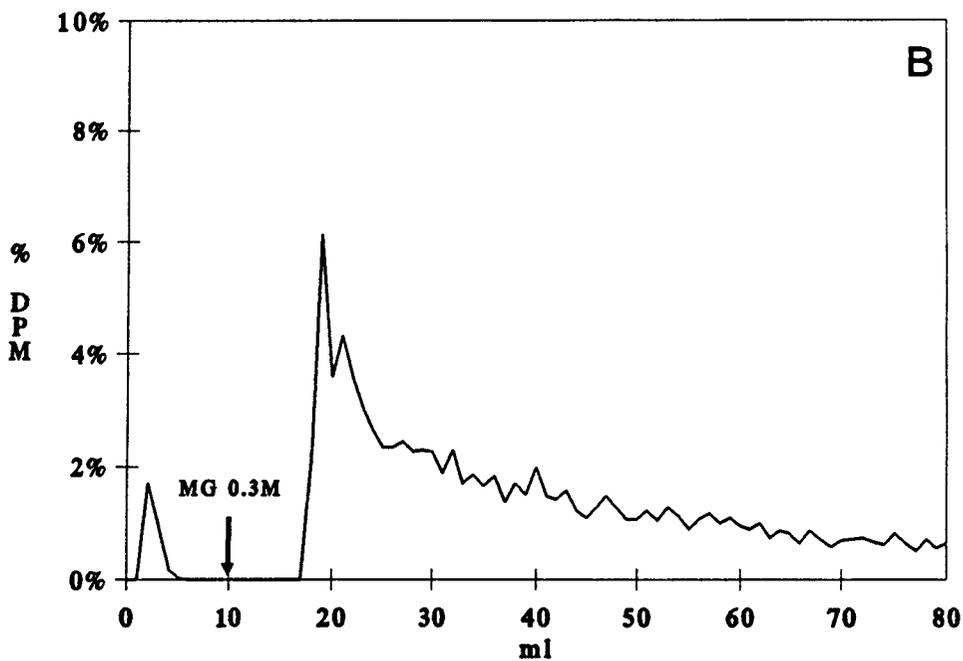
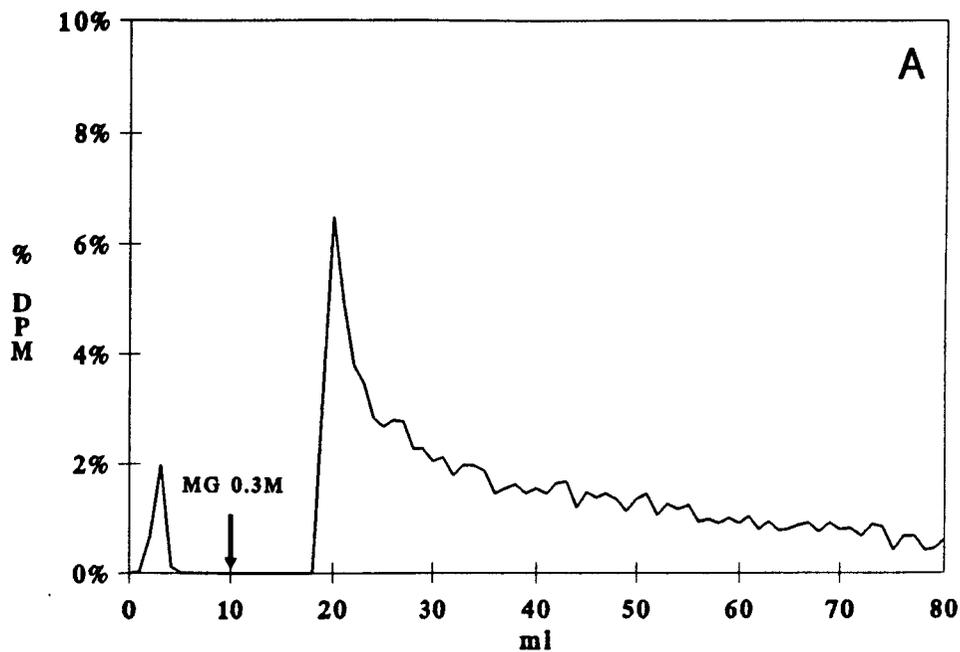


Figure 33 : Profils d'élution de la structure oligomannosidique à 9 résidus de mannose (Structure 5, page 122) sur Con A-silice.

- A. Injection et élution par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 1ml/mn
- B. Injection à 0,1ml/mn et élution (même concentration) à 1ml/mn.

sur Sepharose et nos résultats peuvent se résumer de la manière suivante :

1) En règle générale, le comportement de la Concanavoline A envers la plupart des structures glycaniques n'est pas modifié par l'immobilisation de la lectine sur silice. Des différences n'apparaissent qu'au niveau des forces d'interaction entre les glycanes et la lectine immobilisée.

2) Les structures de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennées (Structures 9, page 123) ne sont reconnues ni par la ConA-silice ni par la ConA-Sepharose (Fig. 34).

3) Les structures de type N-acétyllactosaminique biantennées (Structures 1, 2 et 3) sont toujours faiblement reconnues par la lectine et éluées par une solution d' α -D-méthylglucoside 10mM. Les pics obtenus sont plus fins en mode HPLC par rapport aux conditions normales (Fig. 35). Les conditions d'élution peuvent encore être améliorées en portant la température de la solution d' α -D-méthylglucoside à 40°C (Fig. 35).

4) Les structures de type oligomannosidique à 9 résidus de mannose (Structure 5, page 122) sont très fortement reconnues par la Concanavoline A immobilisée sur Sepharose ou sur silice (Fig. 36). En mode HPLC, leur élution peut être améliorée en portant la température de la solution d' α -D-méthylglucoside à 40°C.

5) Les structures de type hybride de l'ovalbumine (Structures 7 et 8, page 122) ainsi que les structures oligomannosidiques à 5 résidus de mannose (Structure 6, page 122) présentent une interaction plus faible avec la ConA immobilisée sur silice qu'avec la lectine immobilisée sur

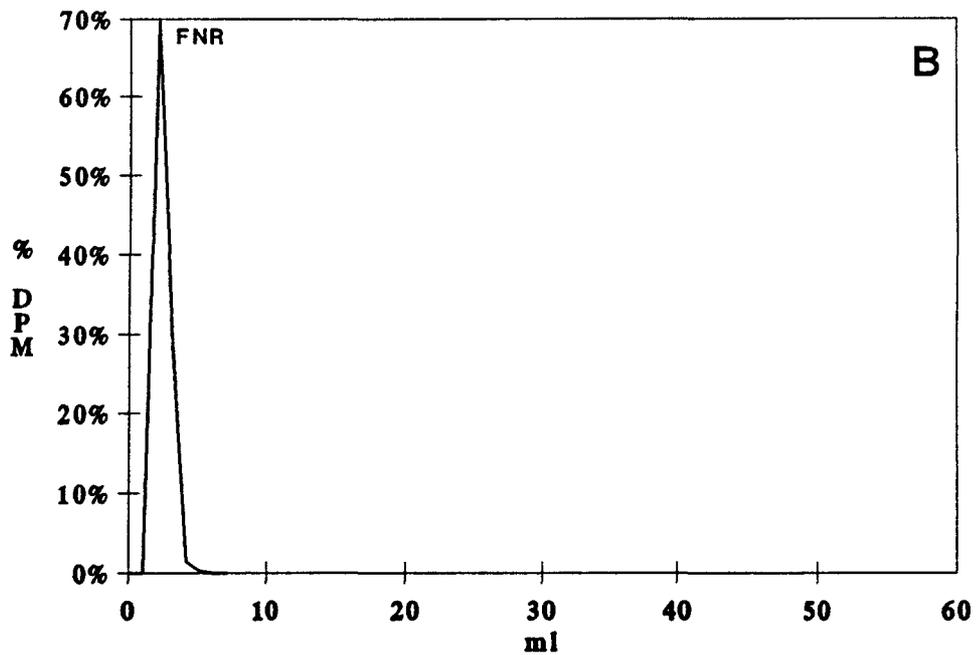
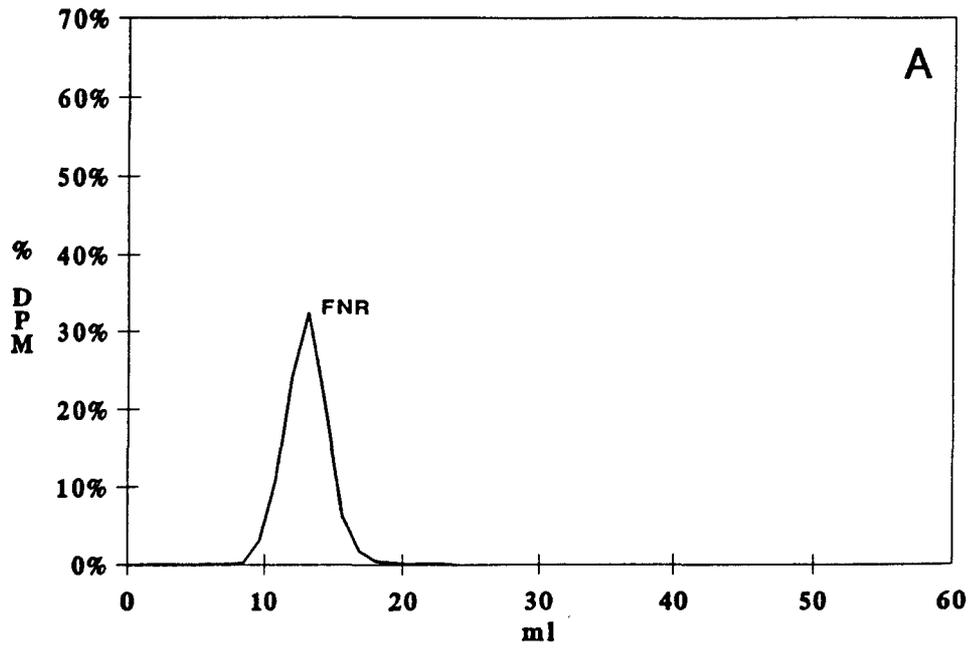


Figure 34 : Profils d'élution de structures de type *N*-acétyllactosaminique tri- et tétraantennées (Structures 9, page 123).

- A. Colonne de ConA-Sepharose
- B. Colonne de ConA-silice.

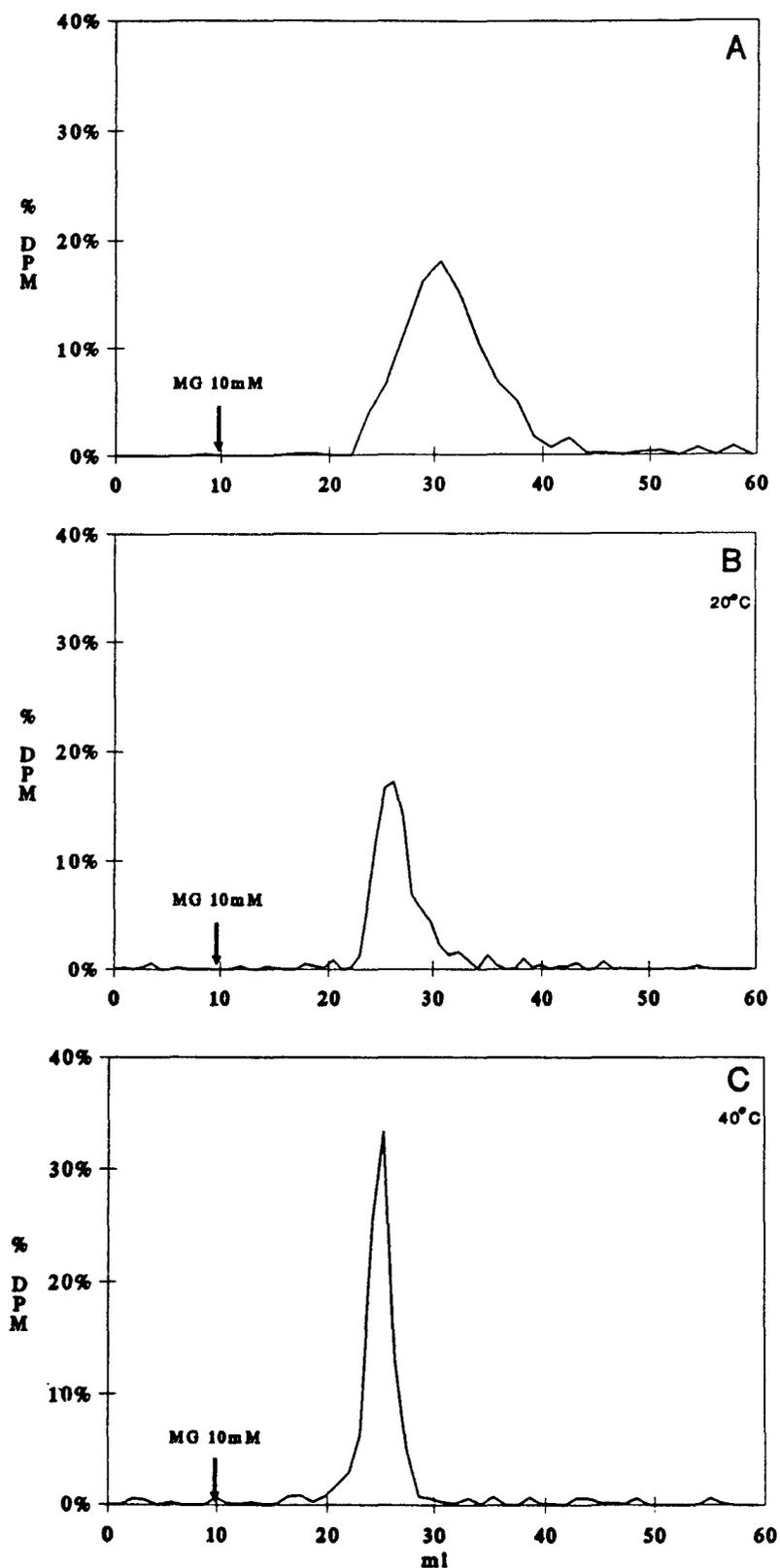


Figure 35 : Profils d'élution de structures de type N-acétyllactosaminique biantennées (Structures 1, page 121) ; élution par une solution d' α -D-méthylglucoside 10mM.

- A. Colonne de ConA-Sepharose
- B. Colonne de ConA-silice à 20°C
- C. Colonne de ConA-silice à 40°C.

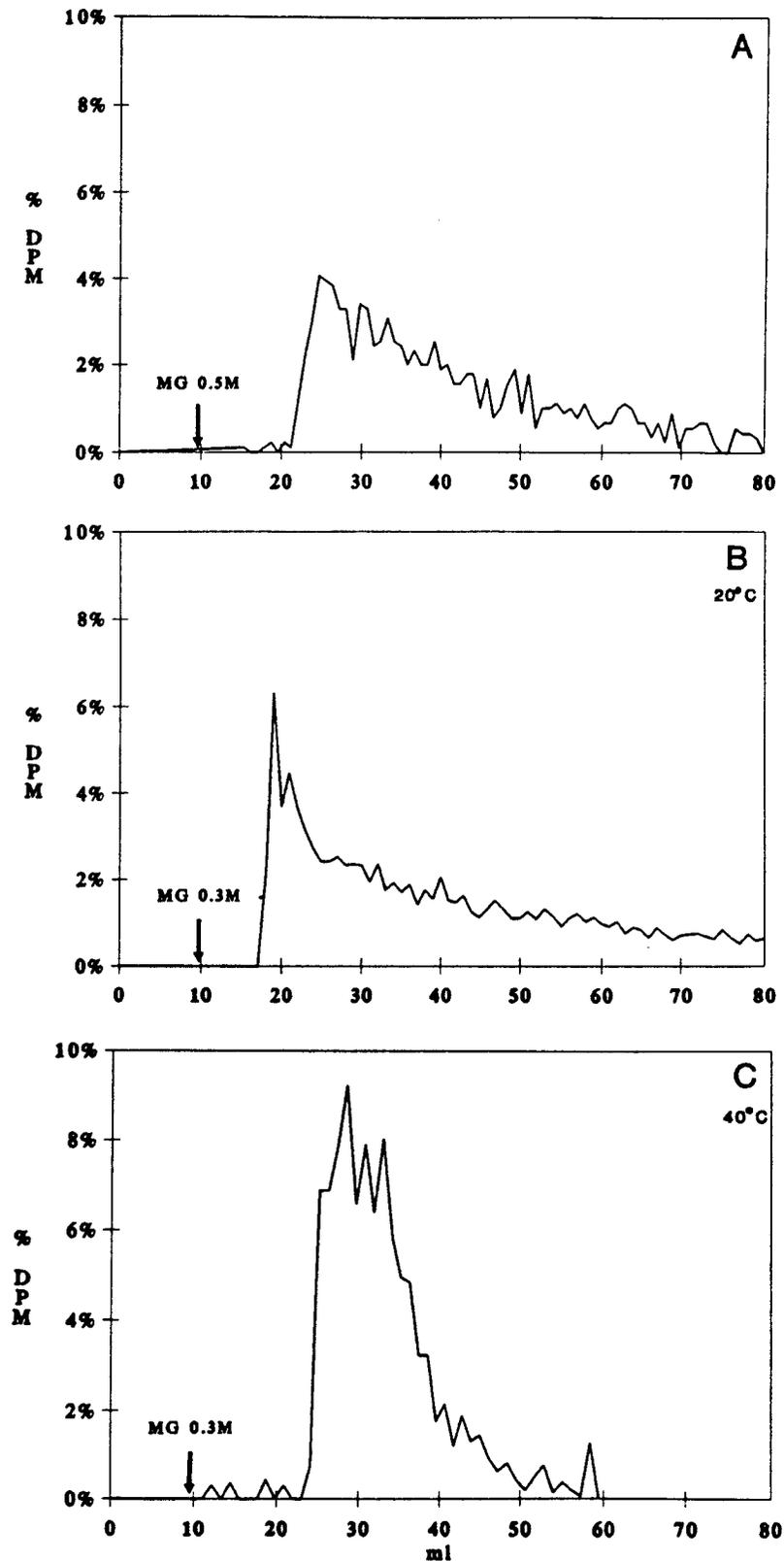


Figure 36 : Profils d'élution de la structure 5 (page 122) oligomannosidique à 9 résidus de mannose.

- A. Colonne de ConA-Sepharose (élution par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,5M).
- B. Colonne de ConA-silice (élution à 20°C par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M).
- C. Colonne de ConA-silice (élution à 40°C par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M).

Sepharose (Fig. 37). Ces structures, fortement retenues sur ConA-Sepharose sont éluées avec une solution d' α -D-méthylglucoside 0,5M, alors que leur élution d'une colonne de ConA-silice en mode HPLC est réalisée avec une solution 10mM. De même, la structure hybride 4 (page 121), retardée sur ConA-Sepharose, n'est plus retenue sur ConA-silice (Fig. 38).

IV.2. Conclusion.

Deux aspects se distinguent principalement de cette étude : la chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A immobilisée est parfaitement transposable en mode HPLC. Si l'on prend des précautions lors de l'injection (débit peu élevé), la lectine conserve son affinité vis-à-vis de la plupart des structures glycaniques testées. Parmi ces dernières, certaines présentent cependant de plus faibles interactions avec la ConA-silice qu'avec la ConA-Sepharose. Il faudra donc tenir compte de ces légers changements de propriétés vis-à-vis des structures hybrides et oligomannosidiques légères lors des futurs fractionnements de glycopeptides membranaires sur ConA-silice.

Afin de rester dans un schéma classique de fractionnement, nous utiliserons une colonne de ConA-Sepharose lors de notre étude de la glycosylation de surface en fonction des phases du cycle cellulaire.

V. FRACTIONNEMENTS SUR LECTINE DE LENTILLE IMMOBILISÉE

V.1. Résultats.

Les performances d'une colonne (10cm x 0,46cm) de LCA-silice contenant 63mg de lectine ont ensuite été comparées à celles d'une colonne de LCA-Sepharose contenant 3 mg de lectine immobilisée par ml de gel (8cmX1cm). Les conditions de débits de chargement (0,1ml/mn)

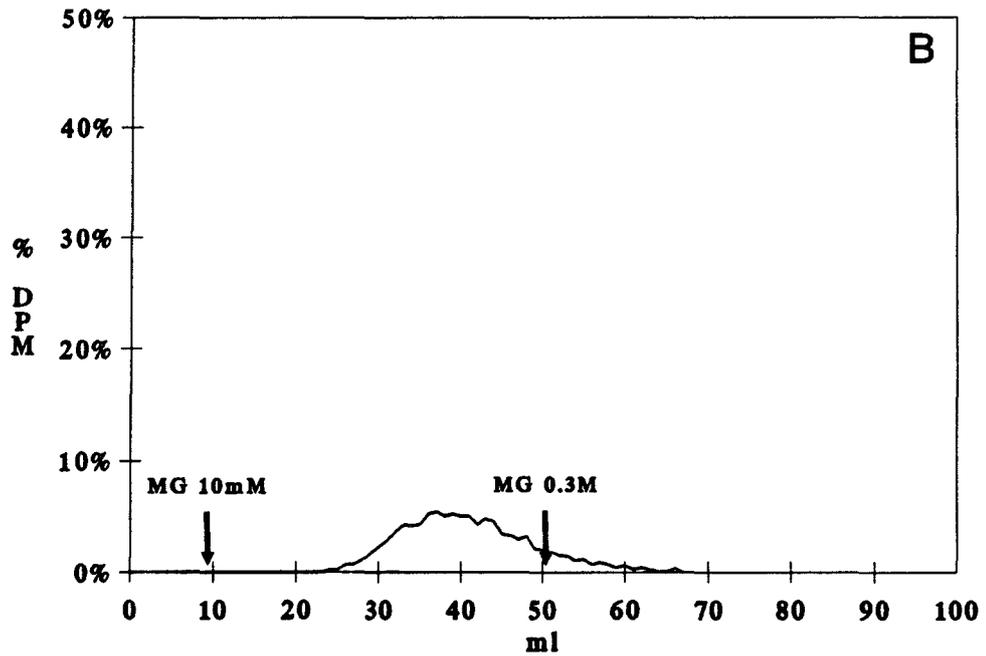
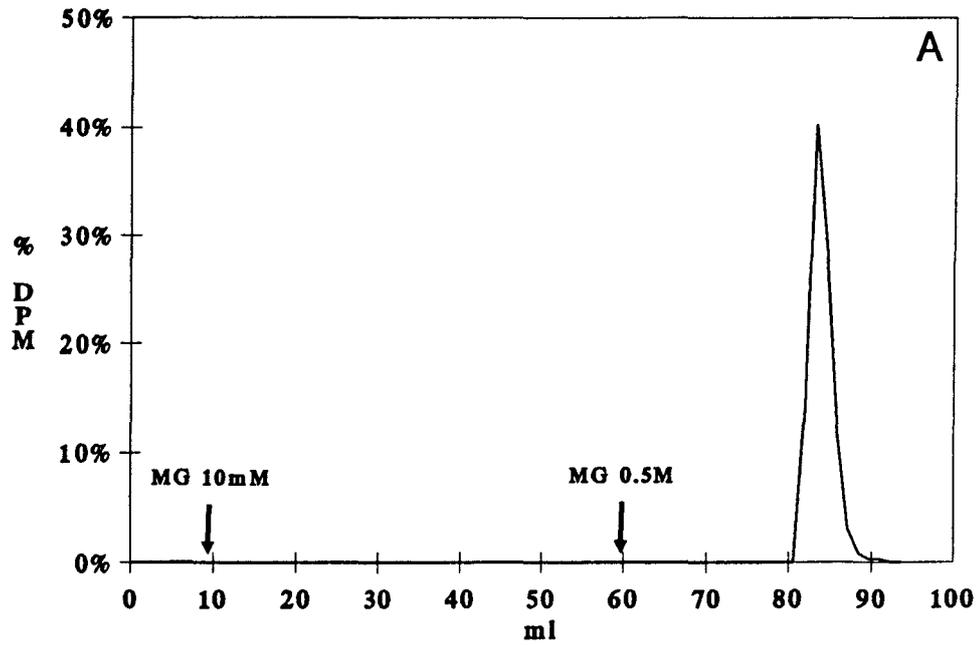


Figure 37 : Profils d'élution de structures hybrides (Structures 7 et 8, page 122) ou oligomannosidique à 5 mannoses (Structure 6, page 122).

A. Colonne de ConA-Sepharose.

B. Colonne de ConA-silice.

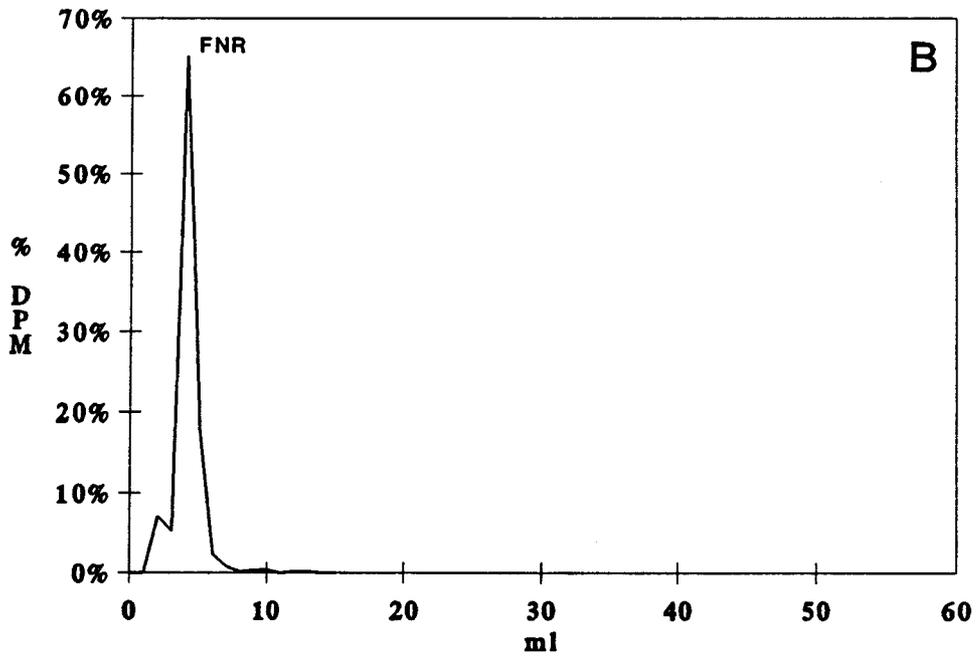
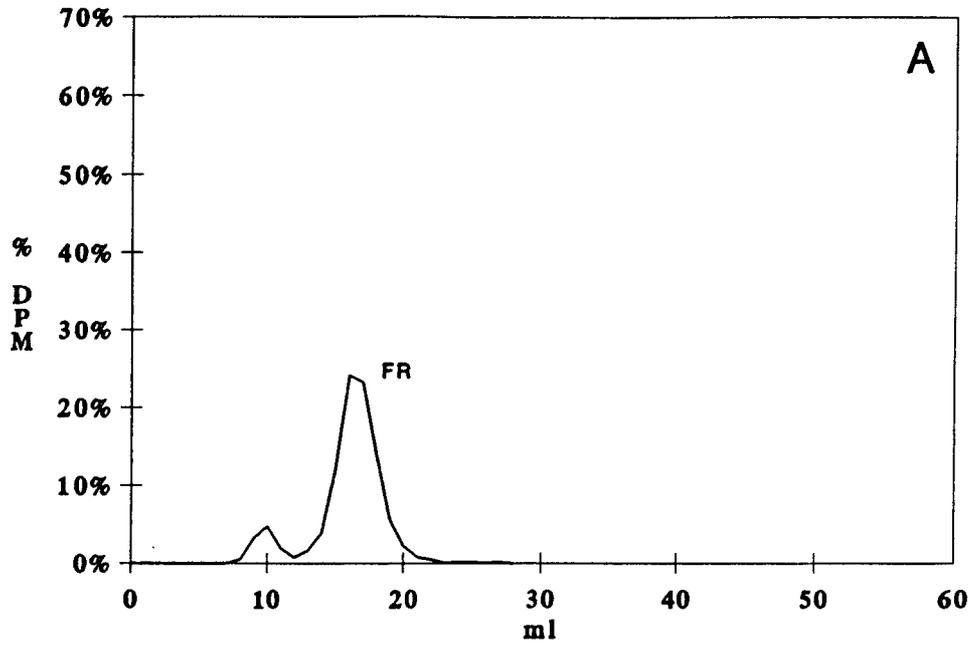


Figure 38 : Profils d'élution d'une structure de type hybride (Structure 4, page 121).

- A. Colonne de ConA-Sepharose.
- B. Colonne de ConA-silice.

et d'élution (1ml/mn) de la colonne de LCA-silice, retenues pour cette étude, sont les mêmes que celles définies pour la colonne de ConA-silice et les résultats obtenus sont les suivants :

1) Les structures de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennées, fucosylées en α -1,6 sur l'osamine du point d'attache (Structures 9, page 123) ne sont reconnues ni par la LCA-silice, ni par la LCA-Sepharose. Il en est de même pour les structures de type oligomannosidique à 5 résidus de mannose (Structure 6, page 122) (Fig. 39 A et B). Par contre, des structures de type oligomannosidique à 9 résidus de mannose (Structure 5, page 122), non retenues sur LCA-Sepharose, sont retardées sur une colonne de LCA-silice (Fig. 39 E et F).

Une baisse de la température d'élution de 20°C à 4°C améliore la séparation entre les structures glycaniques non retenues et les structures glycaniques simplement retardées (Fig. 40).

2) Les structures de type N-acétyllactosaminique biantennés (Structures 1, page 121) ou tri'-antennées (Structures 9 page 123), fucosylées en α -1,6 sur l'osamine du point d'attache sont très fortement retenues par la lectine de Lentille immobilisée sur Sepharose ou sur silice (Fig. 41 et 42). En mode HPLC, leur élution peut être améliorée en portant la température de la solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 40°C (Fig. 41 et 42).

L'élution de ces fractions retenues sur la colonne de LCA-silice peut également être réalisée par une solution d'éthylènediamine 20mM (pH 9) (Fig. 43).

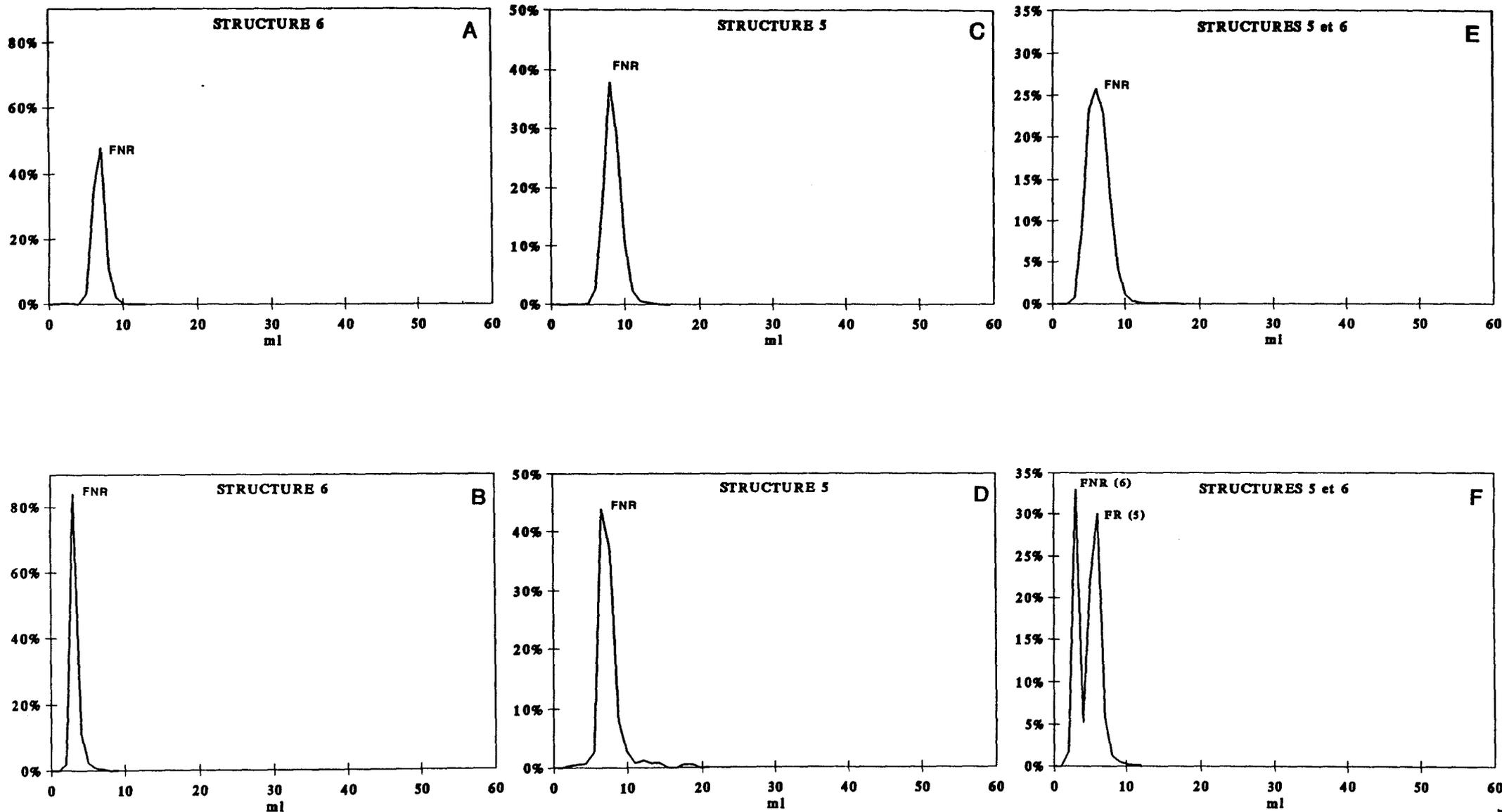


Figure 39 : Profils d'élution de structures de type oligomannosidique.

A. C. E. Colonne de LCA-Sepharose.
 B. D. F. Colonne de LCA-silice.

A. B. Structure à 5 mannoses (Structure 6, page 122).
 C. D. Structure à 9 mannoses (Structure 5, page 122).
 E. F. Co-injection de structures à 5 et 9 mannoses (Structures 6 et 5).

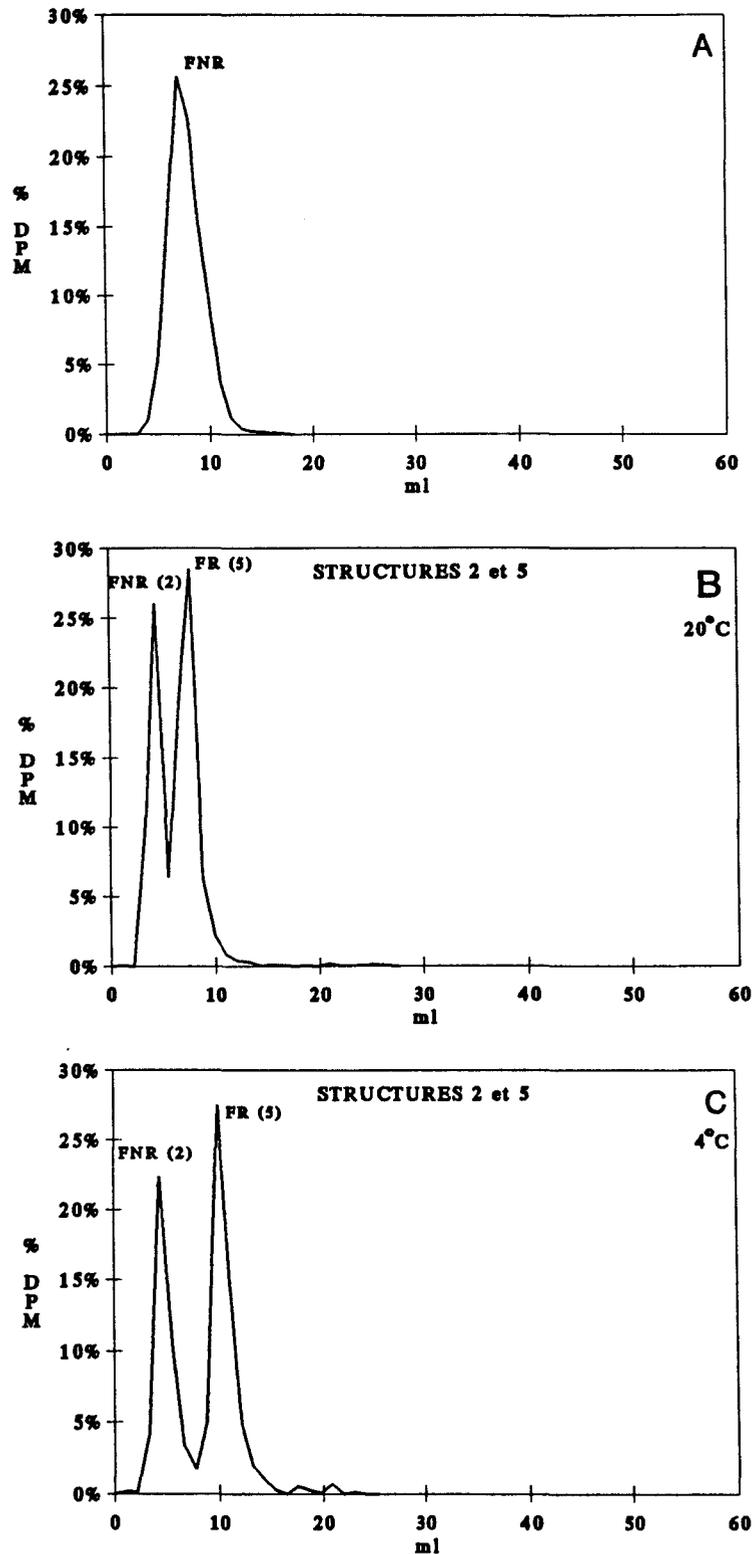


Figure 40 : Co-injection de structures biantennées non-fucosylées sur l'osamine du point d'attache (Structures 2, page 121) et oligomannosidique à 9 résidus de mannose (Structure 5, page 122).

- A. Colonne de LCA-Sepharose
- B. Colonne de LCA-silice à 20°C
- C. Colonne de LCA-silice à 4°C.

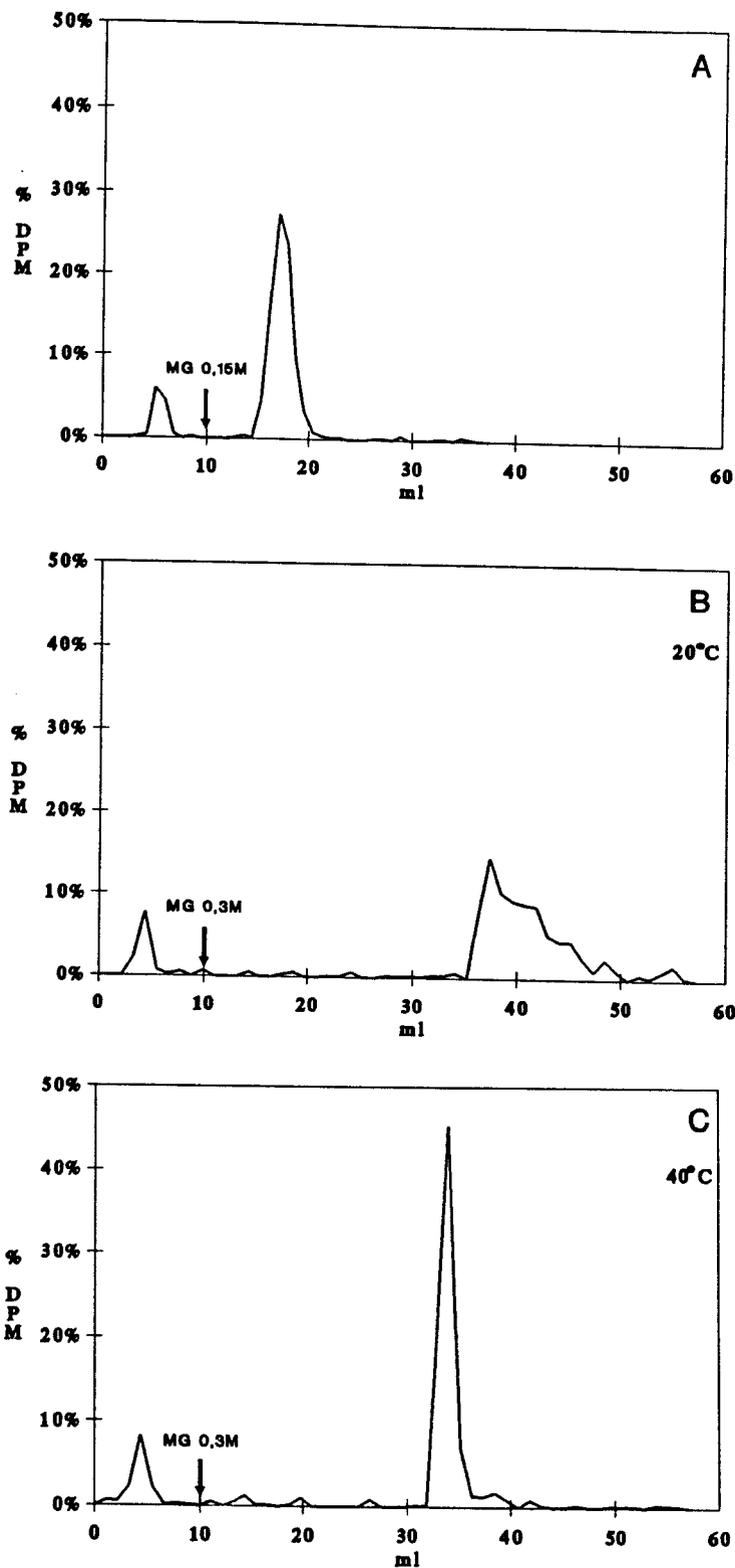


Figure 41 : Profils d'éluion de structures biantennées fucosylées sur l'osamine du point d'attache (Structures 1, page 121).

- A. Colonne de LCA-Sepharose (éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,15M.
- B. Colonne de LCA-silice ; éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 20°C.
- C. Colonne de LCA-silice ; éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 40°C.

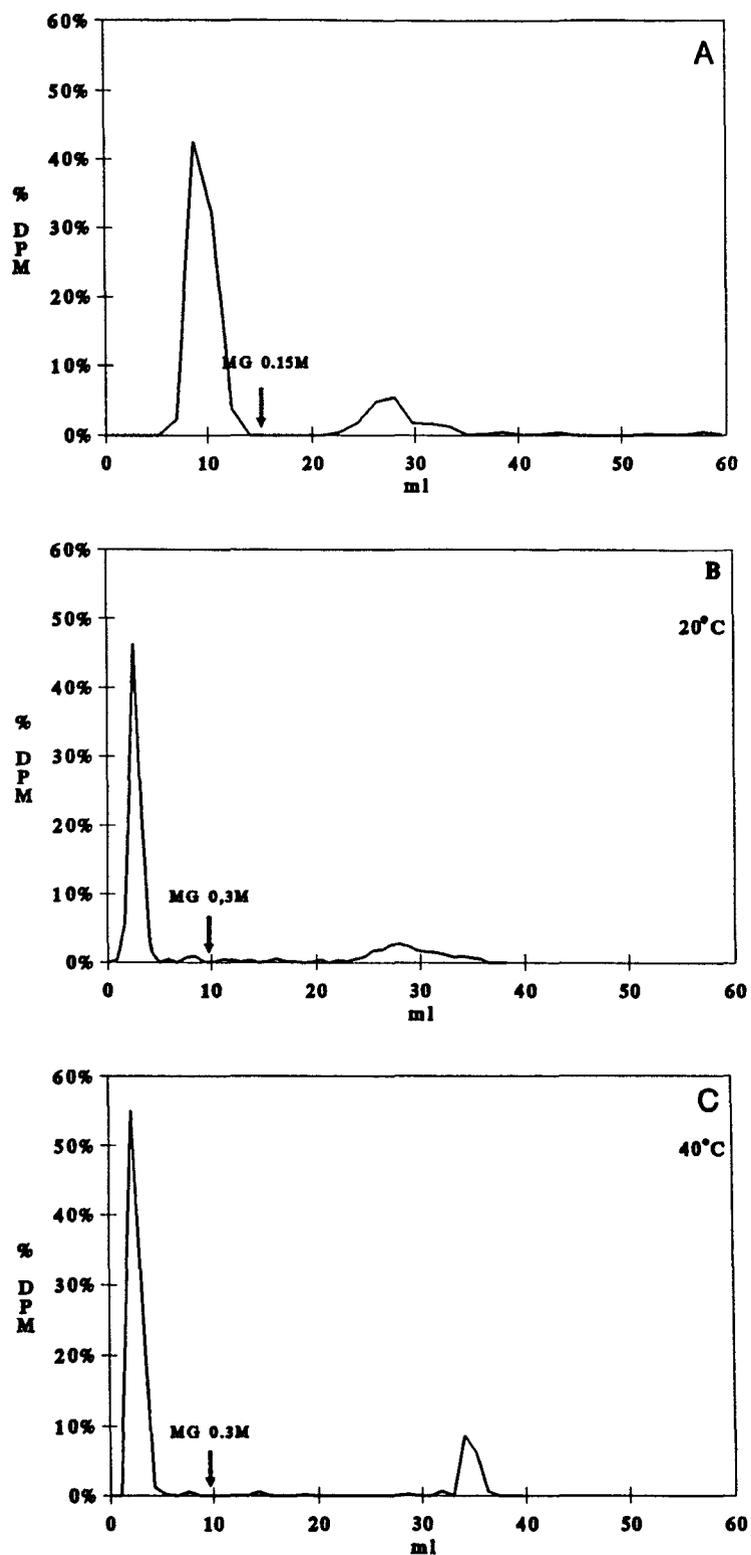


Figure 42 : Profils d'éluion de structures tri- et tétraantennées (Structures 9, page 123).

- A. Colonne de LCA-Sepharose (éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,15M.
- B. Colonne de LCA-silice (éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 20°C.
- C. Colonne de LCA-silice (éluion par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M à 40°C.

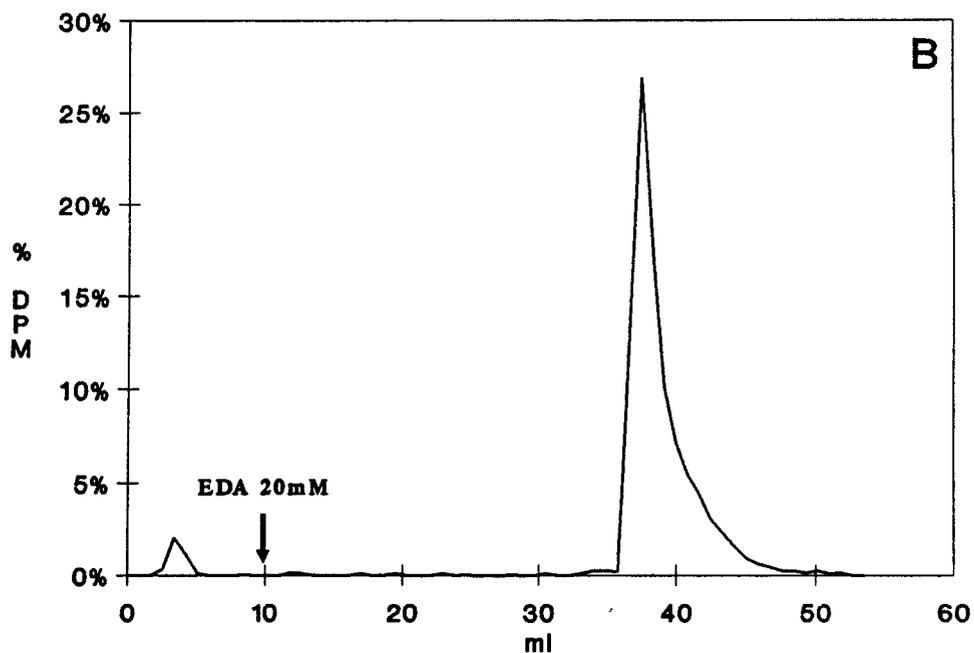
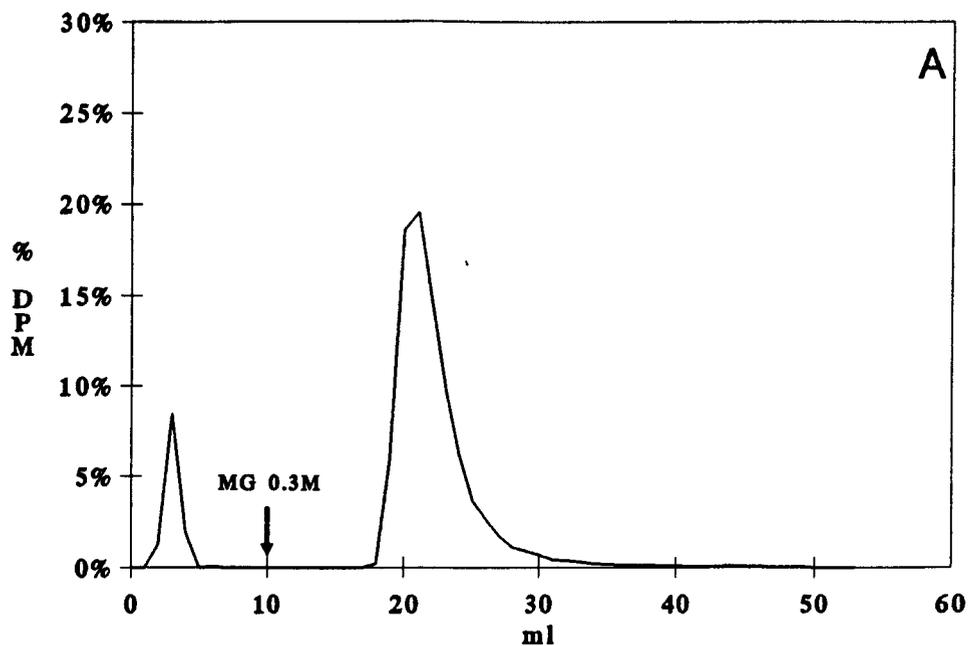


Figure 43 : Profils d'élution de structures biantennées fucosylées sur l'osamine du point d'attache (Structures 3, page 121) sur une colonne de LCA-silice.

A. Elution par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,3M.

B. Elution par une solution d'éthylenediamine 20mM (pH 9).

V.2. Conclusion.

La chromatographie d'affinité sur LCA immobilisée est également une technique parfaitement adaptable en HPLC. Contrairement à la ConA-silice, nous n'observons pas de diminution d'affinité vis-à-vis de certaines structures mais plutôt une augmentation. Ainsi, des structures non fucosylées sur leur osamine du point d'attache tels les oligomannosylpeptides lourds (9 mannoses) peuvent présenter de légères interactions avec cette lectine. De plus, l'utilisation d'un éluant comme l'éthylènediamine facilite les fractionnements en évitant l'emploi de solutions de sucres plus difficilement éliminées.

VI. FRACTIONNEMENTS SUR LECTINE DE SUREAU (SNA-I)

VI.1. Résultats.

Dans le cas de la SNA-I, nous avons également utilisé une colonne de silice (10cm x 0,46cm) contenant environ 40mg de lectine et comparé ses performances à celles d'une colonne (8,5cm x 1,2cm) de SNA-I-Sepharose.

Les deux types de support ne présentent aucune affinité envers les glycanes non sialylés (Fig. 44).

De même, les deux types de lectine immobilisée ne reconnaissent ni la séquence NeuAc(α 2-3)Gal, ni la séquence NeuAc(α 2-6)GalNAcol d'un disialylogosaccharide-alditol (Structure 10, page 123).

Par contre, toutes les structures glycaniques de type complexe présentant un ou plusieurs résidus de NeuAc ou NeuGc(α 2-6)Gal sont reconnues de la même manière par la lectine de Sureau immobilisée sur Sepharose ou sur silice et sont éluées avec une solution de lactose 0,3M (Fig. 45).

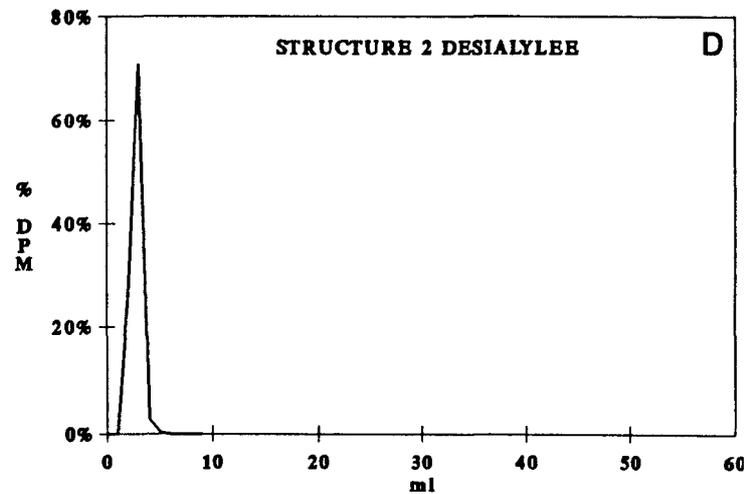
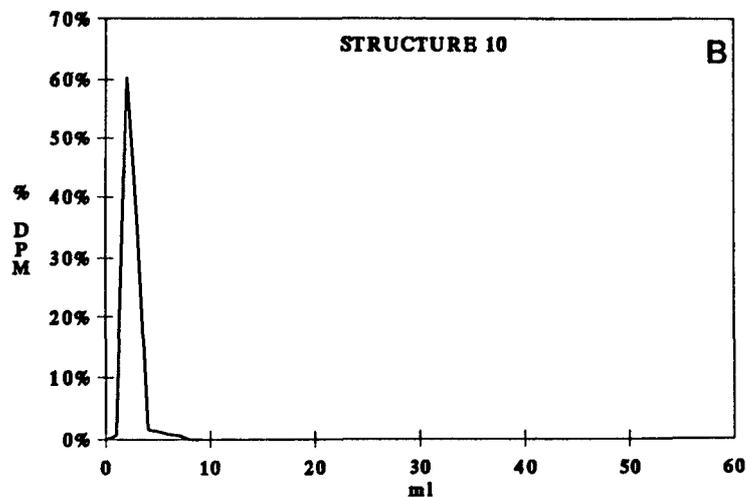
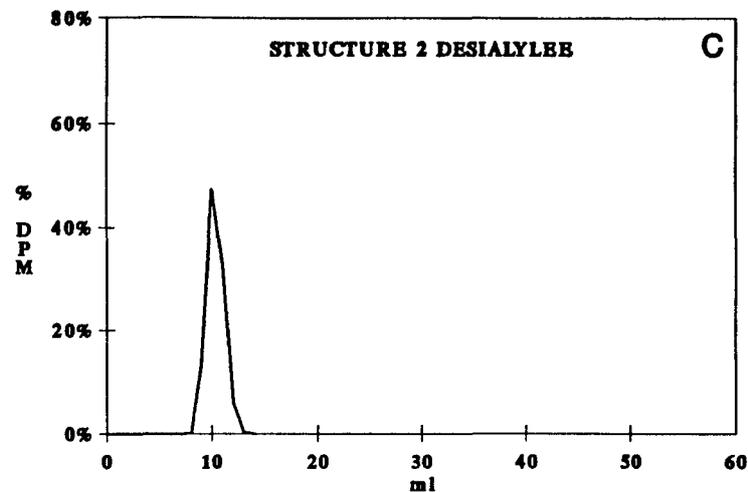
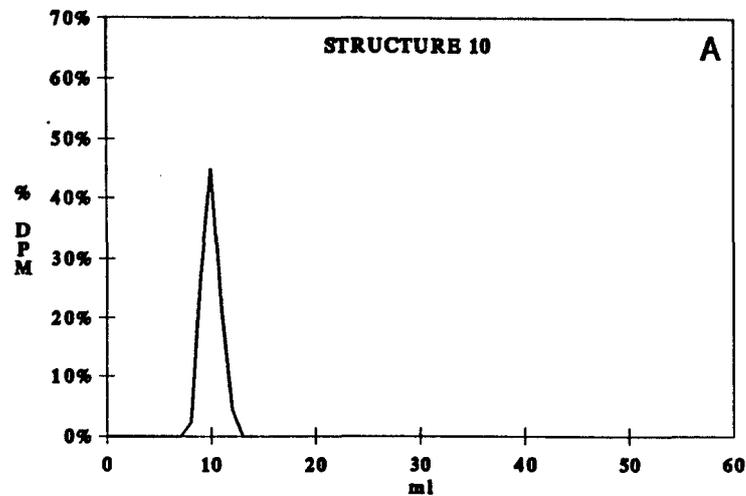


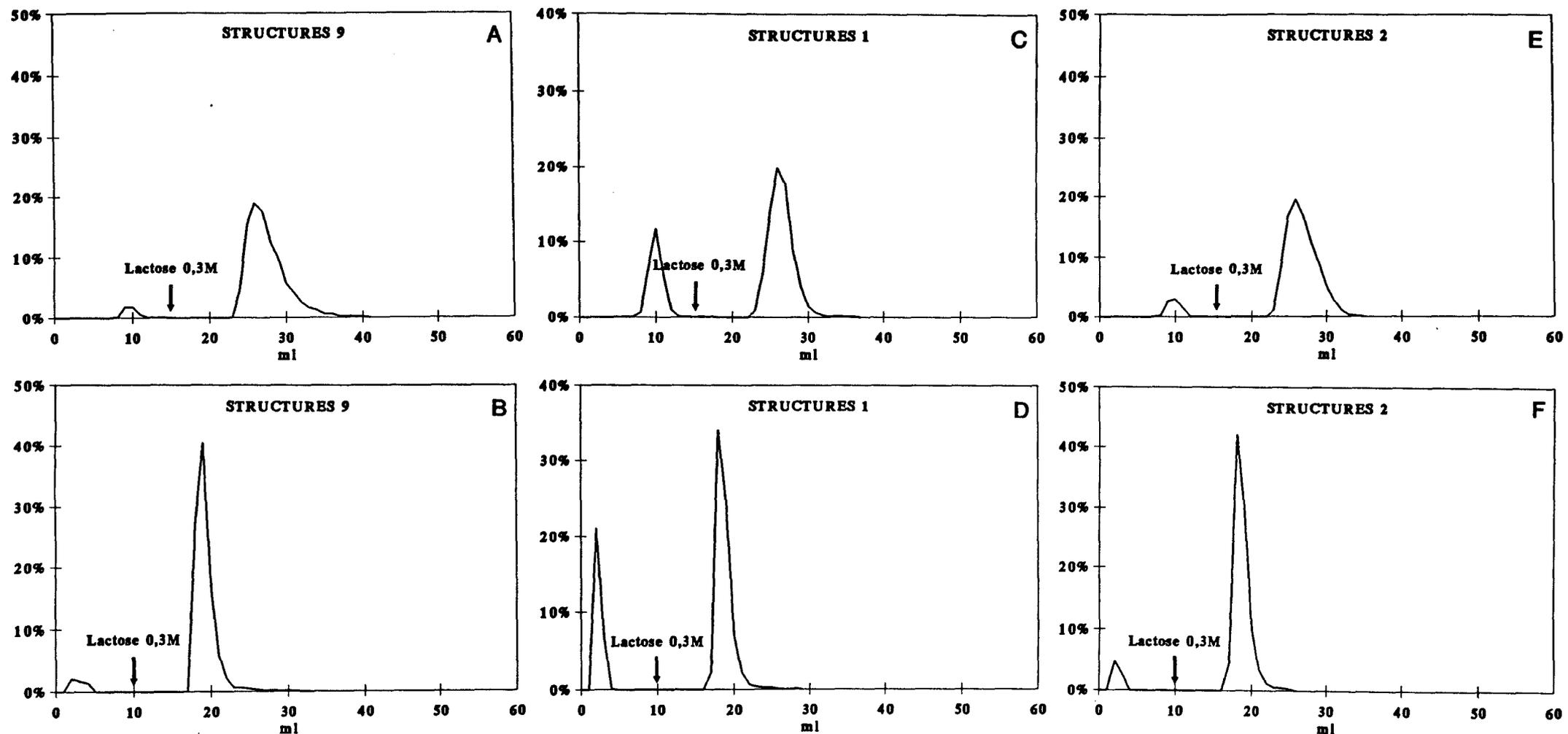
Figure 44 : Profils d'élution d'un asialoglycopeptide biantenné et du disialyloglycosaccharide-alditol.

A. B. Disialyl-féтуine (Structure 10, page 123).

C. D. Asialoglycopeptide biantenné (Structures 2 désialylées, page 121).

A. C. Colonne de SNA-Sepharose.

B. D. Colonne de SNA-silice.



* 144 *

Figure 45 : Profils d'élution de structures sialylées en α -(2,6) (élution par une solution de lactose 0,3M).

A. C. E. Colonne de SNA-I-Sepharose.

B. D. F. Colonne de SNA-I-silice.

A. B. Injection de glycanes tri- et tétraantennés (Structures 9, page 123).

C. D. Injection de glycanes biantennés (Structures 1, page 121).

E. F. Injection de glycanes biantennés substitués à la fois par des résidus d'acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques (Structures 2, page 121).

Comme pour la colonne de LCA-silice, la SNA-I immobilisée sur silice peut être éluée avec de l'éthylènediamine 20mM (pH 9).

VI.2. Conclusion.

Comme dans le cas de la LCA-silice, nous utiliserons la SNA immobilisée en mode HPLC pour nos fractionnements de glycosylpeptides membranaires : cette lectine conserve toutes ses propriétés lors de nos études et l'éluion des structures glycaniques est parfaitement réalisable à l'aide d'éthylènediamine en remplacement du lactose.

VII. CONCLUSIONS

La chromatographie d'affinité de haute performance sur colonnes de lectine immobilisée sur silice permet de réaliser des séparations en minutes et non en heures grâce à une vitesse d'éluion de l'ordre de 0,5 à 2 ml/mn. Cependant, le chargement de la colonne doit être réalisé à un débit très faible (0,1ml/mn), surtout lorsque l'affinité de la lectine immobilisée envers les structures glycaniques qui lui sont présentées est faible.

Un gain de temps appréciable est également obtenu lors de la régénération du support d'affinité.

Le support des colonnes est en silice, résistant aux attaques bactériennes contrairement au Sepharose. De plus, les billes de verre microporeux offrent, par gramme de support, une surface pouvant atteindre 300m^2 , permettant ainsi d'obtenir une plus forte densité en lectine immobilisée et donc une capacité de fixation des structures glycaniques augmentée.

Les affinités des lectines envers les structures glycaniques sont peu modifiées, que ces lectines soient immobilisées sur Sepharose

(chromatographie d'affinité conventionnelle) ou immobilisées sur silice (chromatographie d'affinité de haute performance). Cette reproductibilité de l'affinité de ces lectines envers la majorité des structures glycaniques nous permet de conserver le schéma général de fractionnement décrit précédemment (pages 114 à 116).

De plus, parallèlement à une vitesse de fractionnement beaucoup plus rapide, cette technique nous donne des pics plus fins et donc des volumes d'élution plus réduits.

**Fractionnement des
structures glycaniques.**

I. MATERIELS ET METHODES.

I.1. Marquages radioactifs métaboliques.

Afin de comparer les structures glycaniques associées aux glycoprotéines membranaires des cellules dans des phases de croissance différentes, les fibroblastes sont cultivés en présence de glucosamine tritiée D-[6-³H]GlcNAc ou ¹⁴C D-[1-¹⁴C]GlcNAc (Amersham) aux concentrations respectives de 62,5 μ Ci et 12,5 μ Ci par boîte de 80cm² ou en présence de fucose L-[6-³H]Fuc ou L-[1-¹⁴C]Fuc, dans les mêmes conditions. Ces précurseurs sont ajoutés lors des repiquages. La glucosamine permet principalement le marquage métabolique des résidus de N-acétylglucosamine, de N-acétylgalactosamine et d'acide sialique entrant dans la composition des chaînes glycaniques (Fig. 46).

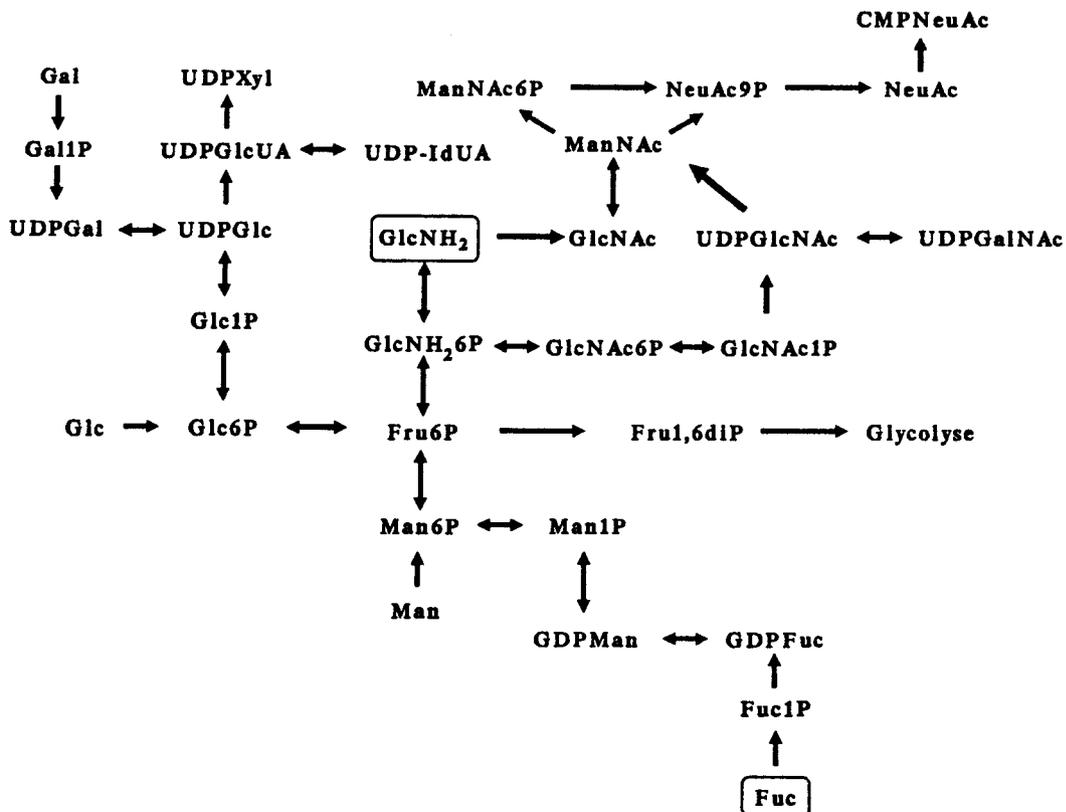


Figure 46 : Résumé des interconversions entre monosaccharides pouvant s'effectuer dans la cellule. A partir de glucosamine radioactive, les principaux résidus saccharidiques marqués sont : la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et les acides sialiques.

I.2. Préparation des glycopeptides.

Les culots cellulaires sont délipidés selon la méthode de Oliver et Hemmings (1975), adaptée par Cacan et al. (1980).

I.2.1. Délipidation des culots cellulaires.

Après rinçage, les cellules fixées précédemment à l'éthanol (voir page 87) sont resuspendues dans du PBS pour obtenir un volume final de 400 μ l. Cette suspension cellulaire est ensuite additionnée de 800 μ l de méthanol et de 1200 μ l de chloroforme. Après agitation et centrifugation, nous obtenons trois phases : une phase inférieure organique contenant les lipides neutres et des intermédiaires lipidiques de type dolichols, une phase supérieure contenant des composés plus hydrophiles comme les gangliosides, les glycosyl-nucléotides et oligosaccharides libres ainsi que des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides et enfin, à l'interface, les protéines et glycoprotéines cellulaires (Fig. 47).

La phase inférieure est éliminée et les lipides neutres résiduels sont réextraits de la phase supérieure quatre fois par 1ml de phase inférieure théorique (86 volumes de chloroforme pour 14 de méthanol et 1 de MgCl₂ 4mM).

Afin d'éliminer les dernières traces de gangliosides et d'oligo-saccharides libres, le précipité protéique est lavé trois fois par 2ml de phase supérieure théorique (composée de : CHCl₃/CH₃OH/MgCl₂ 4mM dans les proportions 2/48/47 en volume). Le culot est rincé par 2ml d'eau, puis subit une dernière extraction, quatre fois par 1,5ml de mélange 10/10/3 (CHCl₃/CH₃OH/H₂O) afin d'éliminer les intermédiaires de synthèse du cycle des dolichols. Si deux phases apparaissent lors de l'addition du mélange 10/10/3, il suffit d'ajouter goutte à goutte le mélange CHCl₃/CH₃OH (1/1) pour obtenir un système monophasique.

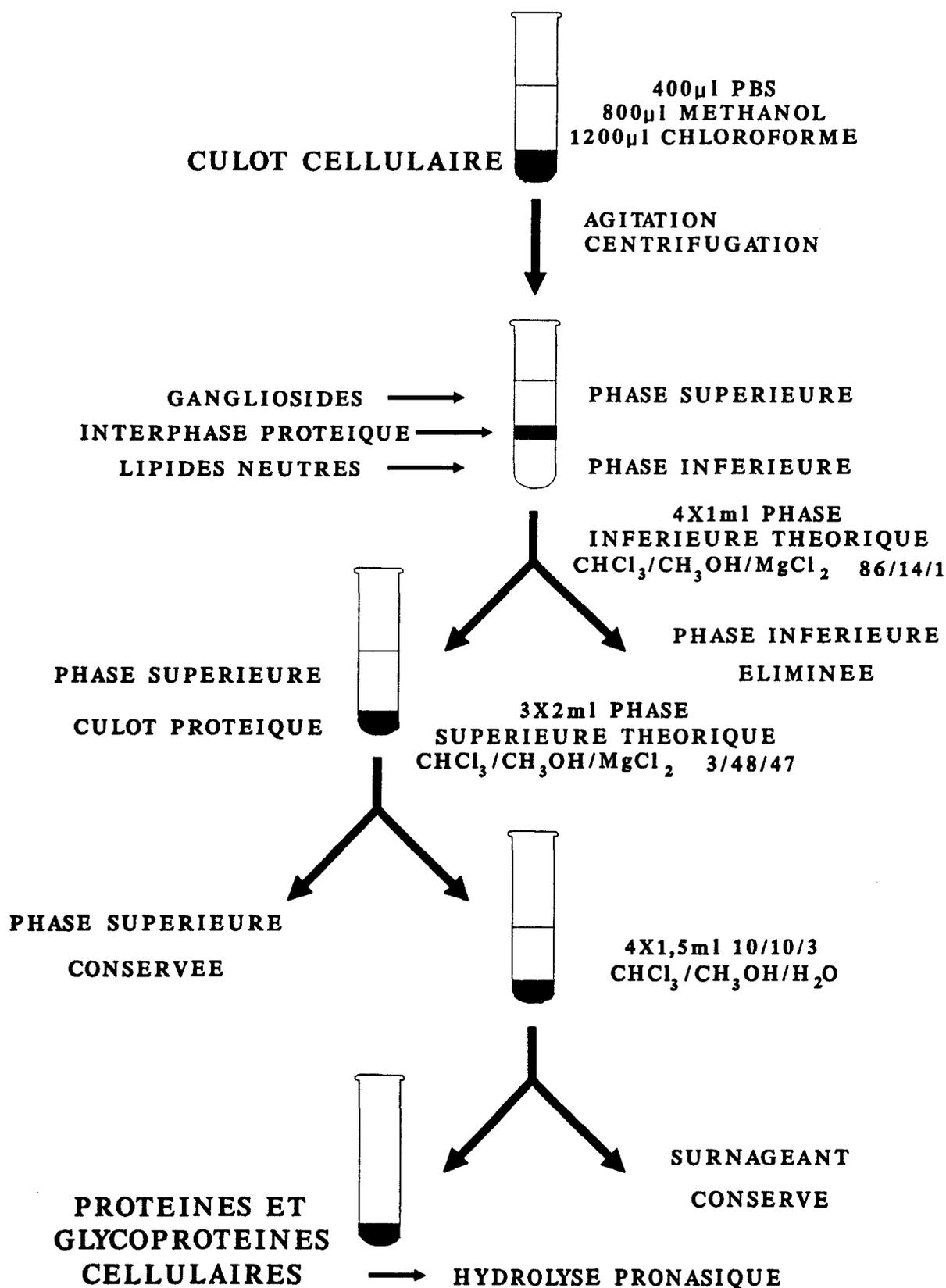


Figure 47 : Délipidation des culots cellulaires selon une méthode dérivée de celle d'Oliver et Hemming (1975).

Après évaporation des dernières traces de solvants organiques, les protéines et glycoprotéines cellulaires subissent une hydrolyse pronasique afin d'obtenir des glycopeptides.

I.2.2. Hydrolyse pronasique.

Le culot de protéines et de glycoprotéines cellulaires est dissous dans 7ml de tampon Tris/HCl 0,1M à pH 8,4 contenant 10mM en CaCl_2 . L'hydrolyse se déroule à 37°C sous agitation, en trois cycles de 24h, chacun d'eux comprenant une addition de 5mg de Pronase (Calbiochem). Avant d'être utilisé, l'hydrolysats est dessalé sur une colonne (80 X 1,8cm) de Biogel P2 (BIORAD) équilibrée dans l'eau, à un débit de 10ml/h. Chaque repérage en sortie de colonne s'effectue par la mesure de la radioactivité d'une fraction aliquote à l'aide d'un compteur à scintillation liquide LS 6000TA (Beckman), le liquide scintillant utilisé étant l'Aqua Luma plus (Lumac LSC).

Après concentration, une partie de chaque hydrolysats est comptée afin d'évaluer les quantités respectives de structures issues de chaque lot cellulaire. Les co-fractionnements s'effectueront, au départ, avec la même quantité de radioactivité en tritium et en ^{14}C , avec un minimum de 400 000 dpm de chaque isotope.

II. FRACTIONNEMENTS.

II.1. Chromatographie de gel filtration sur Ultrogel ACA 202.

II.1.1 Mode opératoire.

Les glycopeptides sont repris par un volume de 1-2ml maximum de tampon Tris/HCl 0,05M à pH 7,4 contenant 0,17M en NaCl et 0,02% d'azide de sodium. Nous ajoutons également du rouge de phénol afin de visualiser la fin du fractionnement.

Cette solution est déposée sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 (IBF) (94 X 1,8cm), équilibrée dans le tampon précédent. Le débit d'élution est de 10ml/h et des fractions de 1,4ml sont récoltées par un collecteur Redirac (LKB). La radioactivité de 200 à 500 μ l de chaque fraction (suivant la radioactivité déposée sur la colonne) est mesurée afin d'établir le profil d'élution de chaque lot glycopeptidique.

II.1.2. Résultats.

Chaque fractionnement sur Ultrogel ACA 202 est caractérisé par l'obtention de deux fractions majeures : une première fraction lourde F1, éluee au volume mort de la colonne, renferme des protéoglycannes ainsi que des O-glycosylpeptides de masse moléculaire élevée, dont la partie peptidique était inaccessible à l'action de la pronase. Une seconde fraction retardée (F2) correspond aux N-glycosylpeptides. Ces deux fractions seront ultérieurement étudiées séparément.

II.1.2.a. Comparaison des structures glycanniques de fibroblastes à différentes phases de croissance.

Dans un premier temps, nous avons comparé des cellules en division active (phase exponentielle de croissance) aux mêmes cellules au repos (cultivées à confluence) afin de déterminer si la croissance cellulaire était associée à des modifications de la glycosylation des protéines membranaires.

Ainsi, des cellules BHK-21 en division active présentent, par gel filtration, des modifications significatives de leur population glycannique par rapport à ces mêmes cellules en croissance minimale (Fig. 48A) : un enrichissement en N-glycosylpeptides légers (retardés), sans doute de type oligomannosidique ou biantenné incomplet, semble associé à une phase active de croissance, ce qui est en contradiction avec des

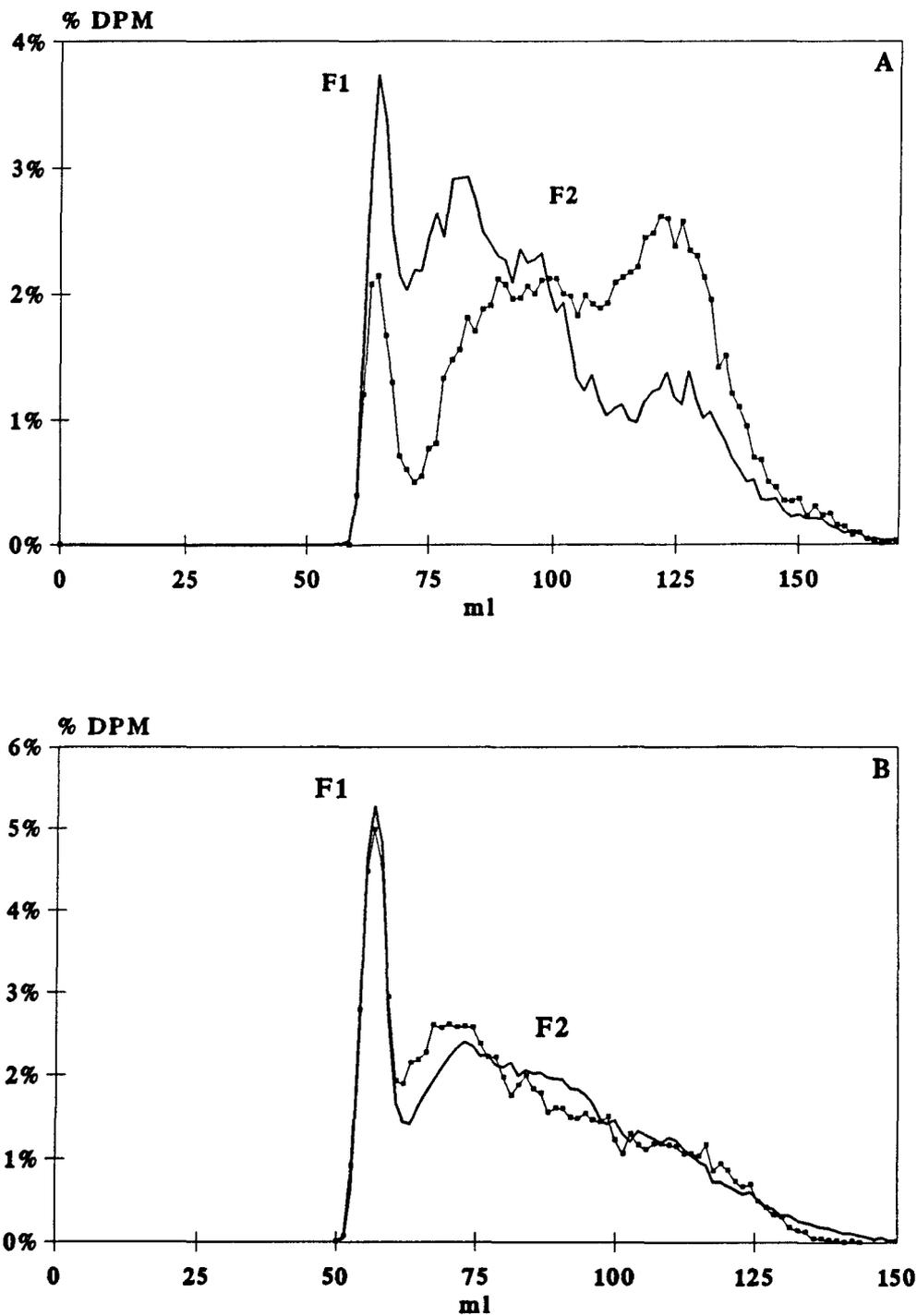


Figure 48 : Profils d'élution sur colonne d'Ultrogel ACA 202 des hydrolysats pronasiques de glycoprotéines membranaires de cellules BHK-21 (A) et NIH 3T3 (B) en phase exponentielle de croissance (—■) et marquées avec de la glucosamine tritiée par rapport aux mêmes cellules cultivées à confluence (—●) et marquées par de la glucosamine ^{14}C ; deux fractions majeures sont obtenues : une première (F1) correspond aux protéoglycannes et une deuxième (F2) comprend la plupart des N-glycosylpeptides.

travaux précédemment cités et qui montraient que des BHK-21 ou des KL2 marquées au L-fucose présentaient un alourdissement de leurs structures glycopeptidiques lorsque les cellules étaient en phase exponentielle de croissance par rapport aux mêmes cellules cultivées à confluence (Buck et al., 1971 ; Muramatsu et al., 1973).

Le même fractionnement effectué à partir d'un autre fibroblaste (NIH 3T3) donne un résultat moins prononcé (Fig. 48B). Il est à noter que les profils obtenus à partir des fibroblastes NIH 3T3 et BHK-21 présentent des aspects totalement différents : comme le confirme le tableau XIII, les NIH 3T3, marqués à la glucosamine tritiée ou ^{14}C , sont caractérisés par des structures beaucoup plus lourdes (F1) que les BHK-21.

Tableau XIII : Répartition des glycosylpeptides de fibroblastes BHK-21 et NIH 3T3 à différents états de croissance après fractionnement sur Ultrogel ACA 202. La fraction F1 contient les protéoglycannes et les O-glycosylpeptides et la fraction F2 la plupart des N-glycosylpeptides.

BHK-21	PHASE EXPONENTIELLE	PLATEAU TARDIF
	G1/S/G2M (%) 35/33/32	G1/S/G2M (%) 85/10/5
F1	10%	19%
F2	90%	81%

NIH 3T3	PHASE EXPONENTIELLE	PLATEAU TARDIF
	G1/S/G2M (%) 40/28/32	G1/S/G2M (%) 65/22/13%
F1	33%	34%
F2	67%	66%

Une deuxième série de fractionnements nous permet de vérifier si ces variations concernent plus particulièrement une ou plusieurs phase(s) du cycle cellulaire.

II.1.2.b. Comparaison des structures glycaniques présentes dans des cellules quiescentes ou en phase mitotique.

Un enrichissement en cellules mitotiques est obtenu grâce à un blocage par de la vinblastine sulfate sur des cellules en phase exponentielle de croissance (voir p. 106).

Les fibroblastes normaux (BHK-21, Fig. 49A) ou transformés (HSV, Fig. 49B) en mitose présentent un enrichissement en structures glycaniques plus légères dans leur fraction F2 (N-glycosylpeptides) par rapport aux cellules en phases G_1/G_0 (voir également tableau XIV), cette différence dans les proportions n'étant pas plus nette que dans le cas précédent des cellules en phase exponentielle comparées aux cellules en plateau tardif. De plus, cette variation n'est pas plus élevée dans les cellules transformées (HSV) que dans les cellules dites normales (BHK-21).

Tableau XIV : Répartition après fractionnement sur Ultrogel ACA 202, des structures glycosylpeptidiques de fibroblastes normaux BHK-21 ou transformés HSV cultivés à confluence ou bloqués en métaphase par de la sulfo-vinblastine. La fraction F1 comprend les protéoglycannes et la F2 la plupart des N-glycosylpeptides.

BHK-21	BLOCAGE VINBLASTINE G1/S/G2M (%) 4/11/85	PLATEAU TARDIF G1/S/G2M (%) 58/19/13
F1	10%	6%
F2	90%	94%

HSV	BLOCAGE VINBLASTINE G1/S/G2M (%) 15/10/75	PLATEAU TARDIF G1/S/G2M (%) 50/30/20
F1	17%	17%
F2	83%	83%

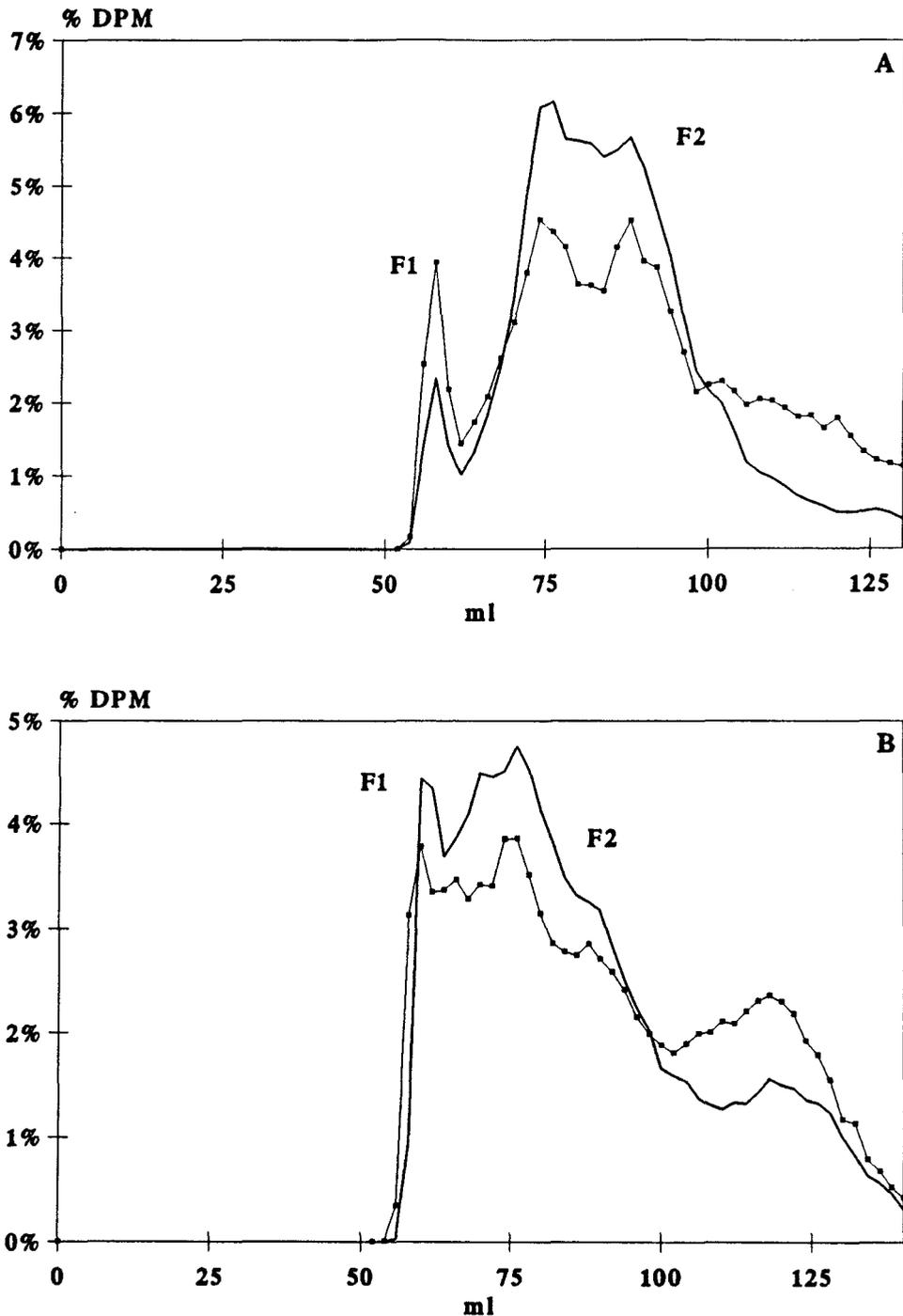


Figure 49 : Profils d'élution sur colonne d'Ultrogel ACA 202 des hydrolysats pronasiques de glycoprotéines membranaires de cellules BHK-21 (marquage fucose) (A) et HSV (marquage glucosamine) (B) ; les structures glycaniques des cellules bloquées par la sulfo-vinblastine (---) sont comparées à celles de cellules cultivées à confluence (—). Deux fractions majeures sont obtenues : une première (F1) comprenant les protéoglycannes et une deuxième (F2) renfermant les N-glycosylpeptides.

La comparaison des structures glycaniques associées aux glycoprotéines membranaires de fibroblastes NIH 3T3 normaux ou transformés enrichis en cellules mitotiques ou composés majoritairement de cellules en phases G_1/G_0 aboutit aux mêmes conclusions (Fig. 50C et 51A), c'est-à-dire une augmentation des proportions de structures légères pour les cellules en mitose.

II.1.2.c. Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes murins interphasiques.

Les NIH 3T3 sont bloqués (voir p. 94 et 100) en phase S par un double blocage thymidine ou en phase G_2 par l'action du Hoechst 33342 (Fig. 50 A et B). Comparées par co-fractionnement à des populations cellulaires enrichies en phases G_0/G_1 , ces cellules ne présentent plus tant d'hétérogénéité dans leur fraction glycopeptidique, les fractions lourdes (F1) sont cependant plus importantes dans les cellules en plateau tardif (Tableau XV).

Ces différences s'atténuent encore dans le cas des NIH transformées par l'oncogène ras (Fig. 51 B et C) : les lots cellulaires en phases S et G_2 sont également obtenus par double blocage thymidine et par la bisbenzimidazole. Leurs profils d'éluion sont comparés à celui de cellules métaphasiques (blocage sulfo-vinblastine), les profils des cellules interphasiques n'étant pas vraiment différents les uns des autres. Les enrichissements permis par les divers blocages ne sont sans doute pas suffisants.

Comme dans le cas des cellules BHK-21 normales ou transformées, les proportions des protéoglycannes et des N-glycosylpeptides exprimées dans le tableau XV ne révèlent pas de différences significatives suivant les diverses phases du cycle cellulaire.

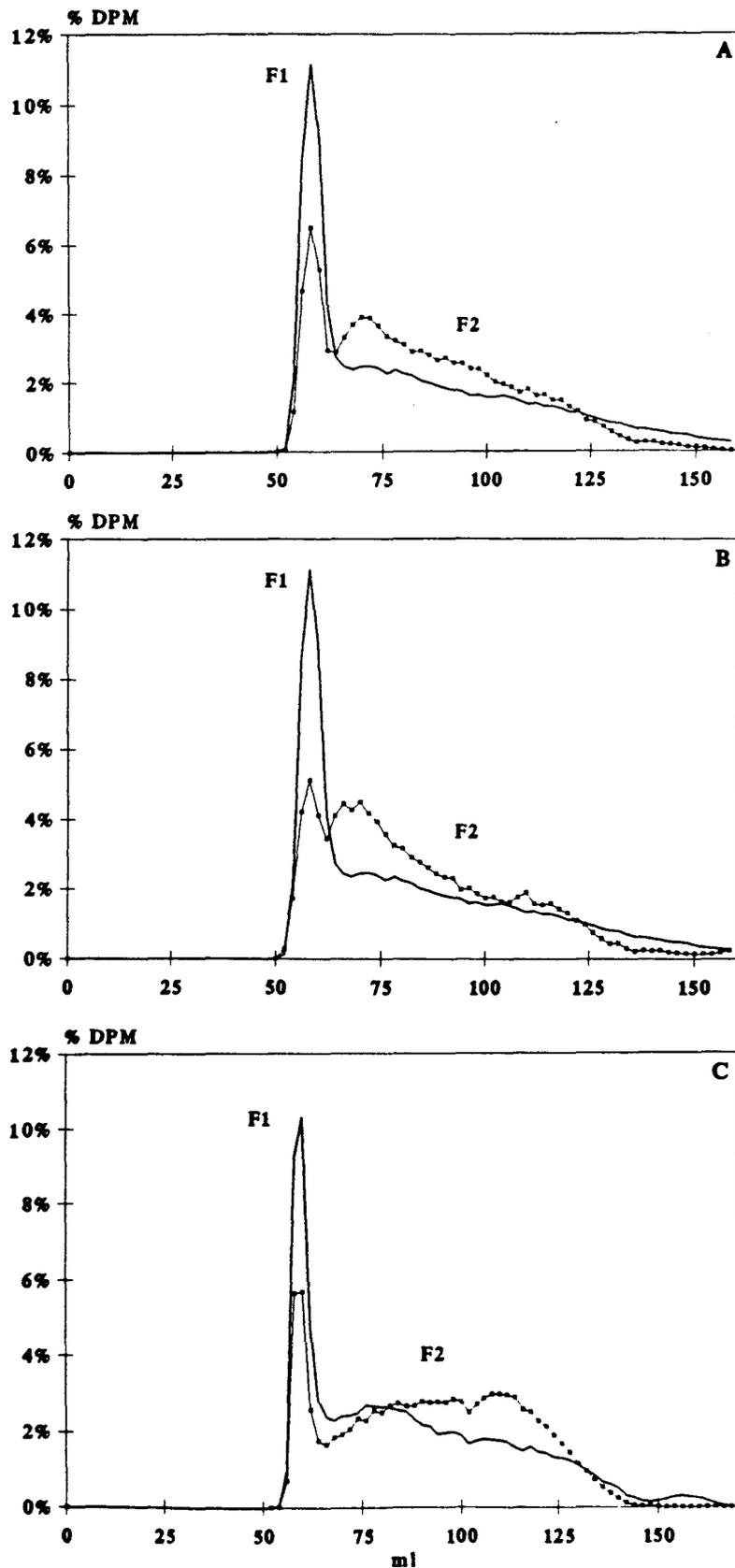


Figure 50 : Profils d'élution sur Ultrogel ACA 202 des hydrolysats pronasiques de glycoprotéines membranaires de cellules NIH 3T3 marquées par de la glucosamine tritiée ou ^{14}C . Les structures glycaniques des cellules cultivées à confluence (—) sont comparées tour à tour à celles présentes dans ces cellules enrichies grâce à un double blocage par la thymidine (A, - - -), un double blocage par la thymidine suivi par l'action du Hoechst 33342 (B, - - -), d'un blocage par la sulfo-vinblastine (C, —). Deux fractions majeures sont obtenues : un premier pic (F1) correspond aux protéoglycannes et glycopeptides non hydrolysés par la pronase et un pic (F2) comprend la plupart des N-glycosylpeptides.

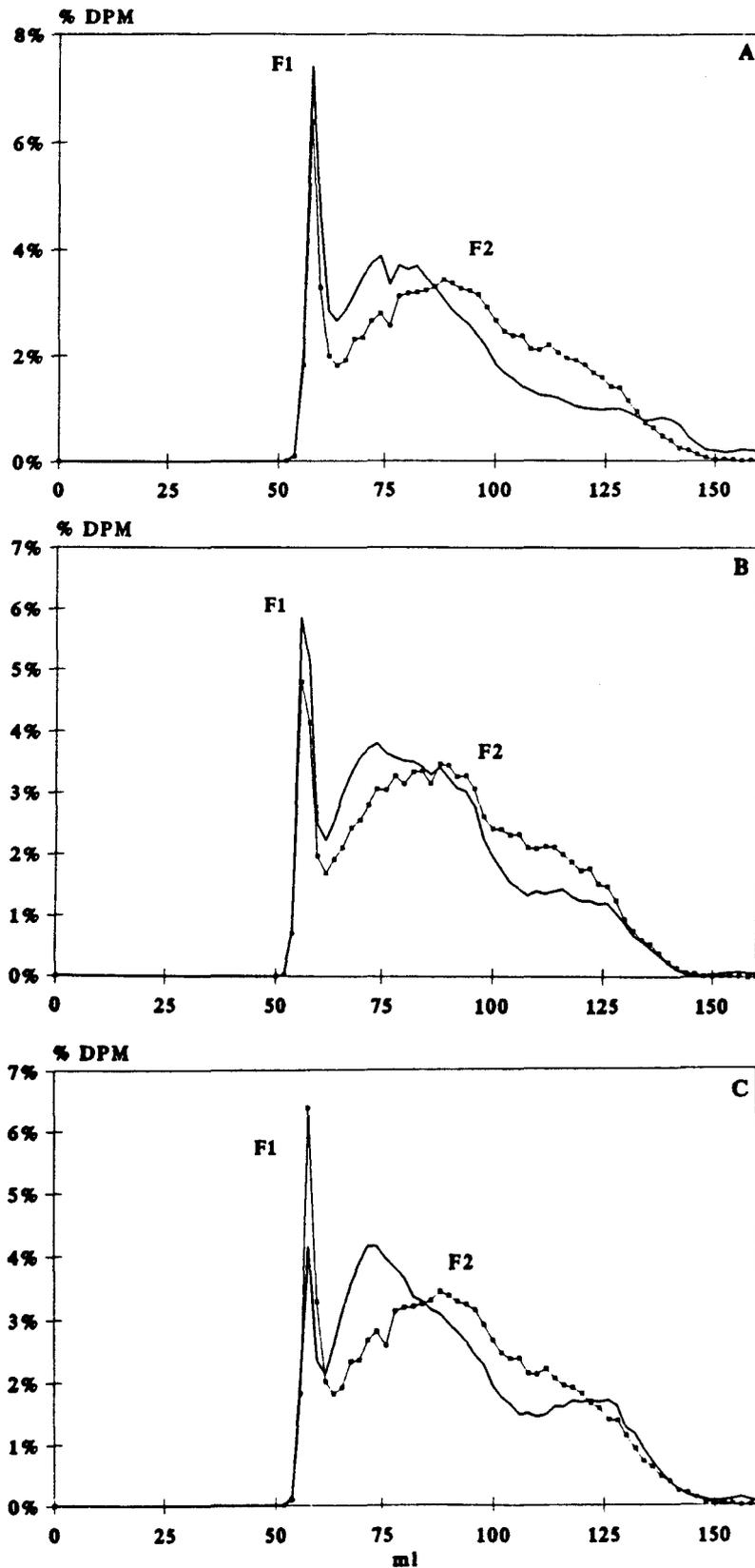


Figure 51 : Cofractionnements sur colonne d'Ultrogel ACA 202 des hydrolysats pronasiques de glycoprotéines membranaires de cellules NIH ras marquées par de la glucosamine tritiée ou ^{14}C . Les structures glycaniques des cellules bloquées par de la vinblastine sulfate (—) sont comparées tour à tour à celles des mêmes cellules cultivées à confluence (A,—) ou ayant subi un double blocage par de la thymidine (B,—), un double blocage par la thymidine suivi de l'action du Hoechst 33342 (C,—). Deux fractions majeures sont obtenues : une première (F1) correspond aux protéoglycannes et une deuxième (F2) comprend la plupart des N-glycosylpeptides.

Tableau XV : Répartition après fractionnement sur Ultrogel ACA 202 de fibroblastes normaux NIH 3T3 ou transformés NIH ras bloqués dans les différentes phases du cycle cellulaire. La fraction F1 comprend les protéoglycannes et la fraction F2 la plupart des N-glycosylpeptides.

NIH 3T3	CONFLUENCE G1/S/G2M 65/24/11	D.B. THYMIDINE G1/S/G2M (%) 13/72/15	HOECHST 33342 G1/S/G2M (%) 15/53/32	VINBLASTINE G1/S/G2M 3/3/94
F1	31%	23%	19%	18%
F2	69%	77%	81%	82%

NIH ras	CONFLUENCE G1/S/G2M 70/20/10	D.B. THYMIDINE G1/S/G2M 32/48/20	HOECHST 33342 G1/S/G2M 32/22/46	VINBLASTINE G1/S/G2M 4/18/78
F1	20%	17%	11%	13%
F2	80%	83%	89%	87%

II.1.3. Conclusion.

Les chromatographies de gel-filtration sur Ultrogel ACA 202 montrent que les structures glycaniques des glycoprotéines membranaires varient en fonction des différentes phases de croissance des cellules en phase de croissance active et en latence. La principale modification concerne une famille de N-glycosylpeptides de faible masse moléculaire, plus abondante dans les cellules en multiplication active.

Dans chaque lot cellulaire, les deux fractions obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne d'Ultrogel ACA 202 sont dessalées séparément en vue d'une étude plus fine de leur composition.

II.2. Etude des glycanes liés O-glycosidiquement.

La fraction F1 obtenue sur Ultrogel ACA 202 renferme principalement des protéoglycannes et des O-glycosylpeptides. Afin

d'étudier la composition de ces derniers, nous avons procédé à une β -élimination en milieu réducteur, libérant ainsi des glycanes sous forme d'oligosaccharide-alditols.

II.2.1. Protocole.

II.2.1.a. β -élimination en milieu réducteur.

Après dessalage, la fraction F1 est reprise par 2ml de NaOH 0,05N contenant du NaBH_4 en concentration molaire. La β -élimination s'effectue sous agitation à 45°C et à reflux durant 16h. Le ballon est ensuite refroidi et plongé dans un bain de glace pour effectuer la neutralisation de la solution par addition de Dowex 50X8 (sous forme H^+).

Les glycanes libérés sont récupérés par filtration sur laine de verre après une élution de la résine par 10 volumes d'eau. La solution est concentrée à sec par évaporation sous vide, reprise par du méthanol et évaporée de nouveau afin d'éliminer les méthylborates formés. Nous effectuons 3 lavages par du méthanol afin d'éliminer le maximum de borate résiduel.

II.2.1.b. Élimination des protéoglycanes.

Les glycanes réduits ainsi obtenus sont ensuite repris par 1ml de tampon ACA 202 et déposés sur la colonne précédemment décrite. Cette nouvelle chromatographie de tamisage moléculaire est également effectuée à un débit de 10ml/h et des fractions de 1,4ml sont collectées.

Deux nouvelles populations glycaniques sont ainsi obtenues (Tableau XVI). La première, éluee au volume mort de la colonne, correspond aux mucopolysaccharides provenant des protéoglycanes ; cette fraction n'a pas été étudiée. La deuxième, plus retardée, correspond aux oligosaccharide-alditols libérés. Cette fraction est dessalée et concentrée en vue d'un nouveau fractionnement.

Tableau XVI : Répartition des protéoglycannes (fraction non retenue) et des oligosaccharides-alditols (fraction retardée) des fibroblastes BHK-21 et NIH 3T3 après β -élimination et fractionnement sur ACA 202.

	BHK-21		NIH 3T3	
	Expo	Plateau	Expo	Plateau
Fraction non retenue	68%	47%	66%	58%
Fraction retardée	32%	53%	34%	42%

NIH 3T3	Plateau	Thymidine	Hoechst	Vinblastine
Fraction non retenue	65%	65%	61%	64%
Fraction retardée	35%	35%	39%	36%

II.2.1.c. Fractionnement sur Biogel P4.

Les oligosaccharide-alditols sont déposés sur une colonne de Biogel P4 (BIORAD) équilibrée dans un tampon acétate de pyridine 0,1M à pH=5,6 (108 X 1,8cm).

Les conditions d'éluion sont les mêmes que pour la colonne d'Ultrogel ACA 202 (10ml/h ; fractions de 1,4ml).

II.2.2. Résultats.

II.2.2.a. Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes en différentes phases de croissance.

Comme le montre la figure 52A (fractionnement de glycanes de BHK-21), la chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P4 donne deux nouvelles populations majeures. La première (100-120ml) contenant des structures lourdes et la deuxième, plus légère, correspondrait aux oligosaccharide-alditols, celle-ci étant plus hétérogène que la première.

Chacune de ces deux populations est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Merck). Une première migration est réalisée dans le système n-butanol/H₂O/acide acétique (2/1/1,5). La

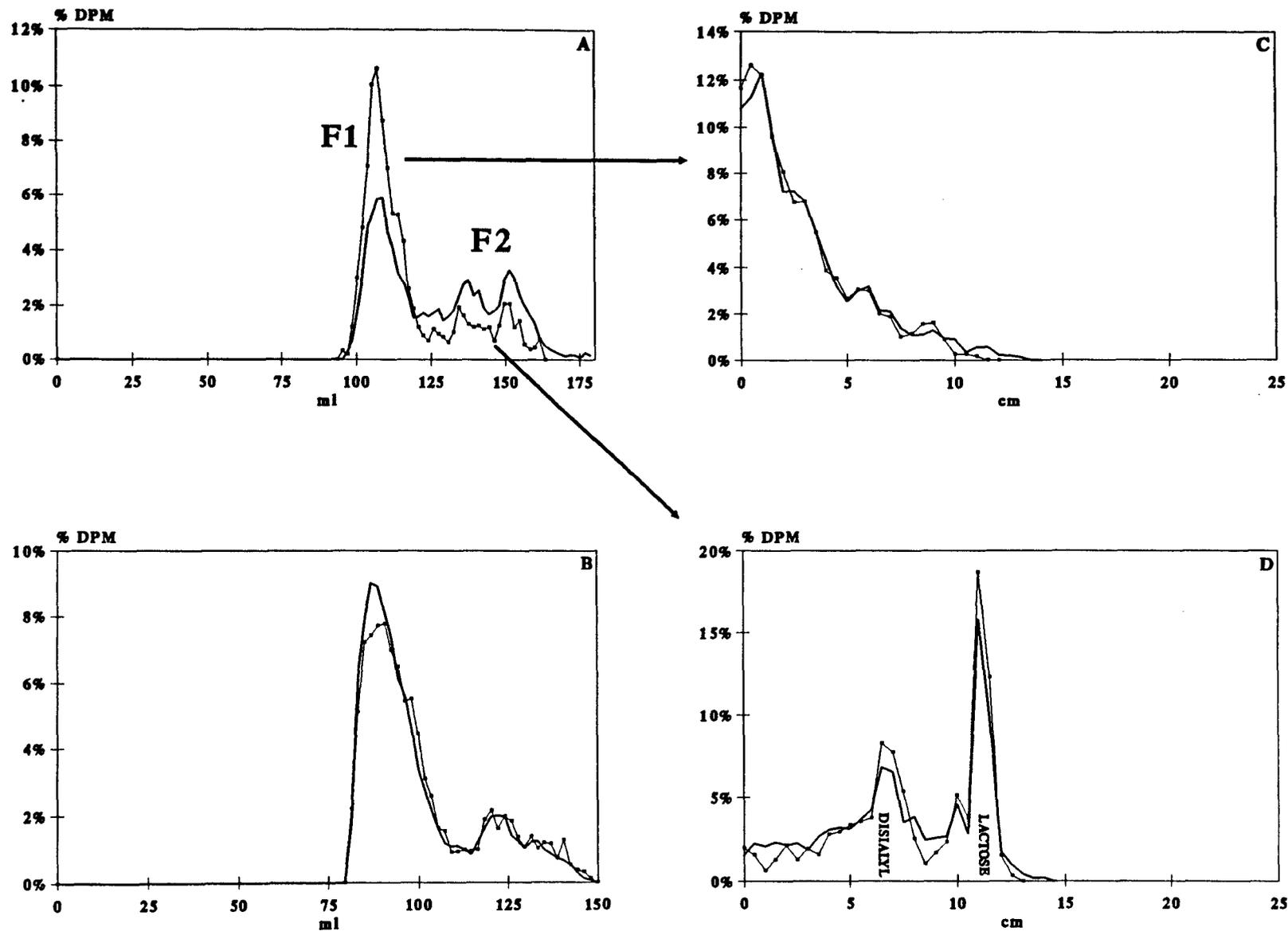


Figure 52 : Profils d'éluion sur colonne de Biogel P4 des oligosaccharides-alditols de BHK-21 (A) et NIH 3T3 (B) en phase exponentielle de croissance (—) ou cultivés à confluence (—) et libérés par β -élimination et débarrassés des protéoglycannes par un passage sur colonne d'Ultrogel ACA 202. Deux populations principales sont obtenues et séparées, dans le cas des BHK-21 (100-125ml et 125-170ml), par migration sur couche mince de silice, migration accompagnée de celle de témoins lactose et disialyl-oligosaccharide-alditol (C et D).

plaque est ensuite soumise à une nouvelle migration dans un solvant plus polaire : éthanol/eau/butanol/pyridine/acide acétique dont les proportions en volume sont (100/30/10/10/5). Un témoin lactose ainsi qu'un témoin disialylogosaccharide-alditol préparé à partir de fétuine (identique au témoin utilisé dans le chapitre sur la chromatographie d'affinité) migrent également dans ces conditions.

La silice est prélevée par grattage de la plaque en zones de 0,5cm, resuspendue dans 500 μ l d'eau et les profils de migration sont établis après comptage de la radioactivité (Fig. 52 C et D).

La population plus lourde reste homogène alors que la fraction plus légère permet de définir au moins deux zones présentant la même migration chromatographique que les témoins lactose et disialylogosaccharide-alditol. Ces zones sont identiques dans le cas des BHK-21 en phase exponentielle de croissance et de ces cellules cultivées à confluence.

De même, l'étude par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Biogel P4 de la fraction oligosaccharide-alditol de fibroblastes NIH 3T3 en phase exponentielle de croissance ou quiescentes ne nous a pas permis de mettre en évidence de différences associées aux glycanes liés O-glycosidiquement (Fig. 52B).

II.2.2.b. Comparaison des structures glycaniques présentes dans des fibroblastes en fonction des phases du cycle cellulaire.

Nous avons confirmé ces résultats en comparant les glycanes de ces mêmes cellules NIH 3T3 traitées par un double blocage par la thymidine (Fig. 53A), par la thymidine et la bisbenzimidazole 33342 (Fig. 53B) et par la vinblastine sulfate (Fig. 53C).

Cette méthode ne nous a pas permis de détecter une éventuelle hétérogénéité de taille des O-glycanes en fonction de l'état de

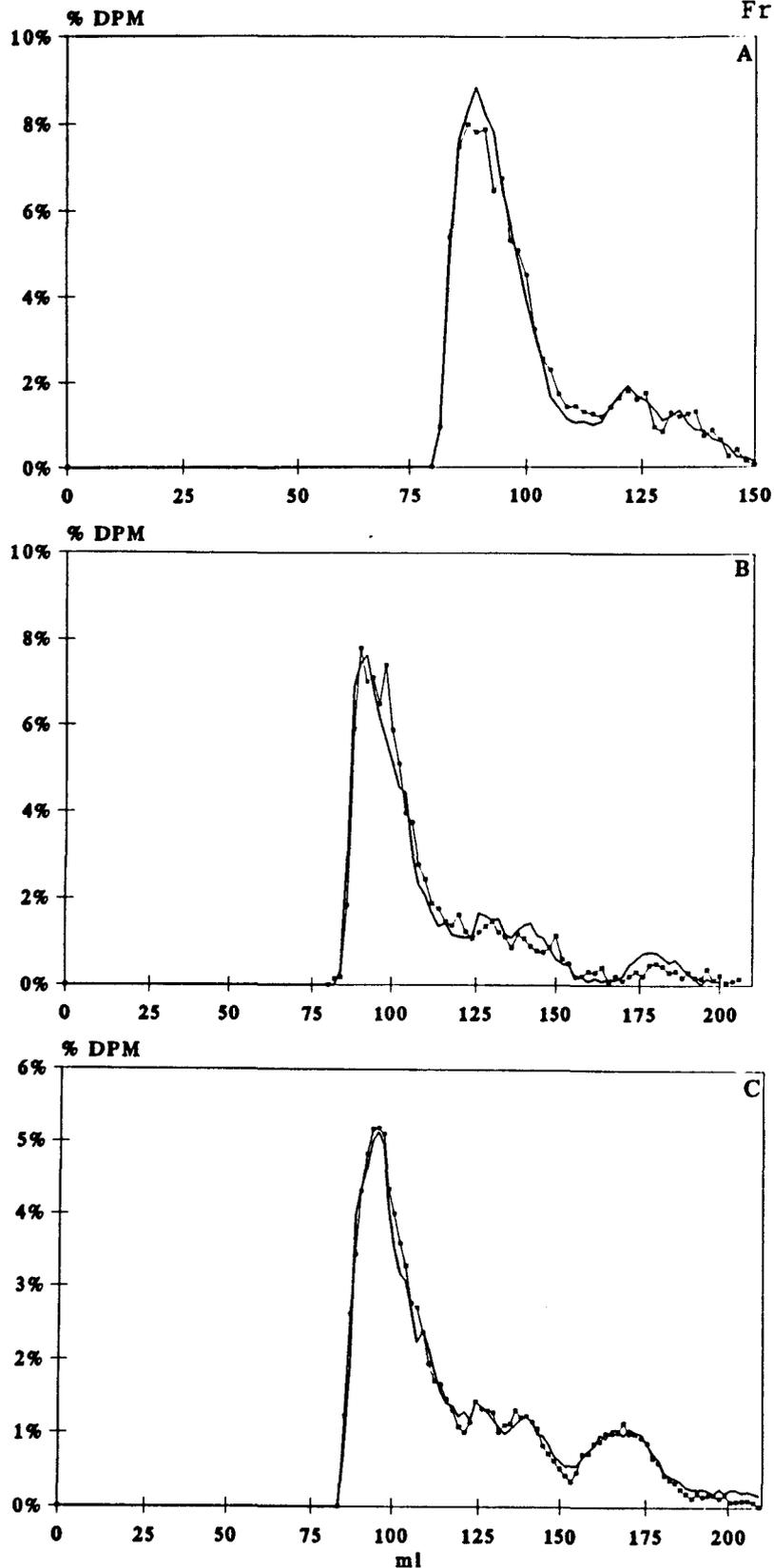


Figure 53 : Profils d'élution sur colonne de Biogel P4 des oligosaccharide-alditols de fibroblastes NIH 3T3 obtenus après β -élimination et débarrassés des protéoglycannes par passage sur colonne d'Ultrogel ACA 202. Les populations fibroblastiques sont enrichies en cellules en phase S par un double blocage thymidine (A, - -), en phase G2 par un double blocage thymidine puis par action du Hoechst 33342 (B, - -) ou en phase mitotique par blocage par la vinblastine sulfate (C, - -) et sont comparées chaque fois à une population enrichie en phase G0/G1 par culture à confluence (—).

croissance (Fig. 52) ou de la position des cellules dans le cycle mitotique (Fig. 53).

La transformation de ces cellules n'y change rien, les fractions O-glycosidiques de NIH ras obtenues par gel-filtration restent homogènes tout au long du cycle cellulaire (Fig. 54).

II.2.3. Conclusion.

La biosynthèse des glycanes liés O-glycosidiquement des fibroblastes NIH 3T3 et BHK-21 ne subit apparemment pas de modifications associées à la division cellulaire. Notre intérêt s'est donc porté sur l'étude des N-glycosylpeptides de la fraction retardée obtenue sur colonne d'Ultrogel ACA 202, fraction présentant une certaine hétérogénéité lors de ce tamisage moléculaire, notamment chez les BHK-21. L'étude qualitative et quantitative de ces structures est permise par l'emploi de lectines immobilisées telles que la ConA, la LCA et la SNA.

II.3. Etude des N-glycosylpeptides.

II.3.1. Chromatographie d'affinité sur Concanavoline A immobilisée.

II.3.1.1. Mode opératoire.

Les glycopeptides de la fraction F2 obtenue sur Ultrogel ACA 202 sont dessalés, concentrés, puis repris par un tampon acétate de sodium 5mM à pH 5,2 et contenant 0,1M en NaCl, 1mM en MgCl₂, 1mM en CaCl₂, 1mM en MnCl₂ et 0,02% d'azide de sodium.

Ils sont ensuite déposés sur une colonne de ConA-Sepharose (10 X 1,3cm) (Pharmacia), équilibrée dans le même tampon. L'élution s'effectue à un débit de 10ml/h et des fractions de 4ml sont collectées.

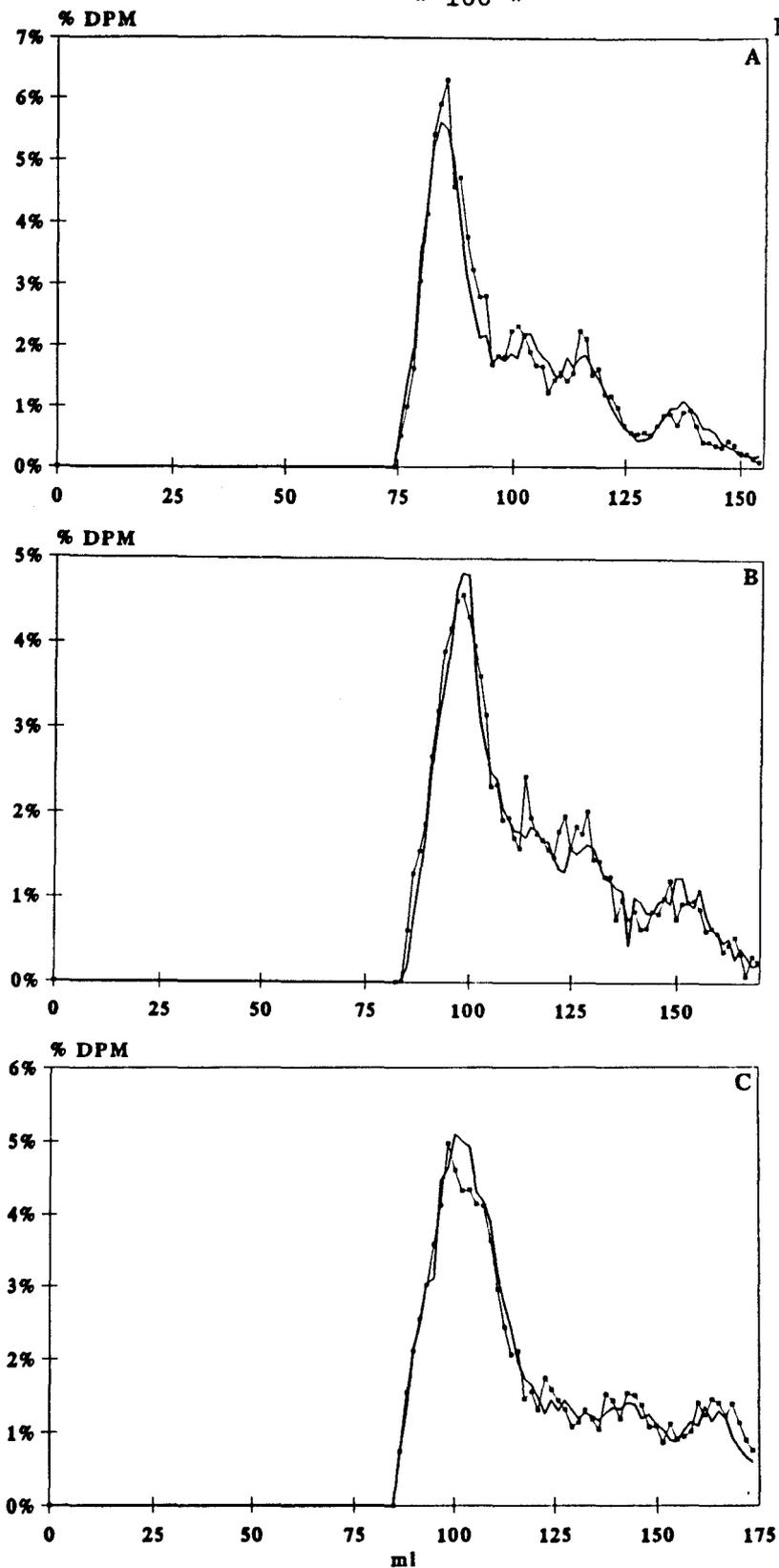


Figure 54 : Profils d'élution sur colonne de Biogel P4 des oligosaccharide-alditols de fibroblastes transformés NIH ras obtenus après β -élimination et élimination des mucopolysaccharides par passage sur colonne d'Ultrogel ACA 202. Les populations fibroblastiques sont enrichies en phase G₀/G₁ par culture à confluence (A, —), en phase S par double blocage thymidine (B, —), en phase G₂ par blocage par le Hoechst 33342 (C, —) et comparées dans chaque cas à une population enrichie en phase mitotique (---) par blocage par la sulfo-vinblastine.

La première fraction obtenue contient les structures de type N-acétyllactosaminique tri- et tétraantennées ou biantennées à glucosamine intercalaire (Fig. 55), structures non reconnues par la Concanavaleine A et constituant la fraction non retenue (FNRC).

Une solution d' α -D-méthylglucoside 10mM dans le même tampon acétate permet ensuite l'éluion des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique (FEC 10mM).

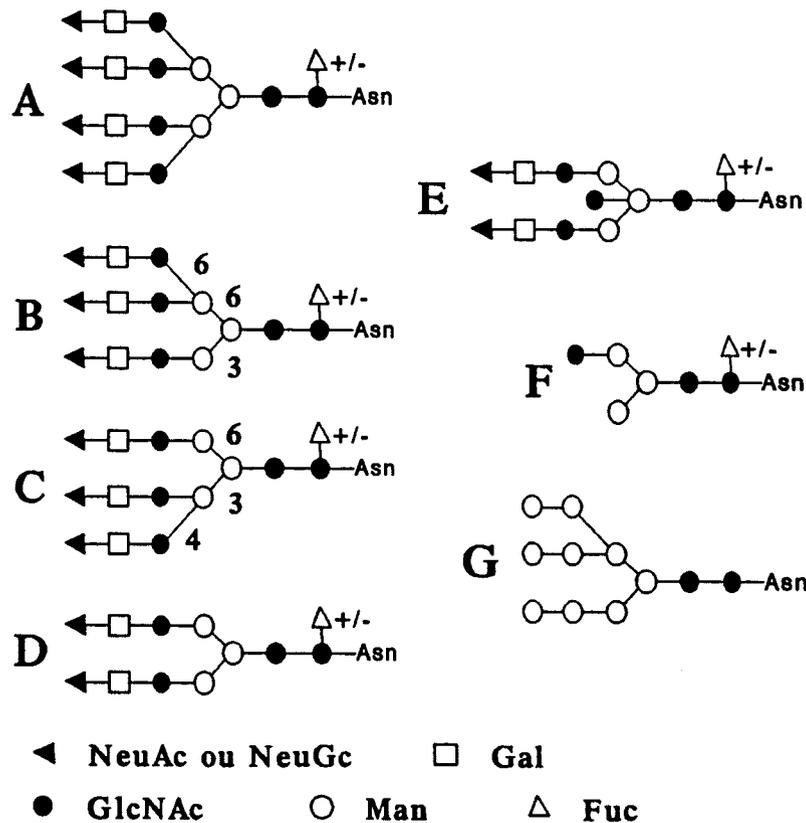


Figure 55 : Symboles utilisés pour représenter les différentes structures fractionnées sur lectines immobilisées : glycanes de type N-acétyllactosaminique tétra- (A), tri- (B), tri- (C), bi- (D) antennés, biantennés à N-acétylglucosamine intercalaire (E), biantenné incomplet (F) et structure oligomannosidique (G).

Enfin, une solution d' α -D-méthylglucoside à une concentration de 0,5M est utilisée pour éluer les structures oligomannosidiques, ainsi que

les structures de type N-acétyllactosaminique biantennées incomplètes très fortement retenues par la Concanavoline A (FEC 0,5M).

II.3.1.2. Résultats.

II.3.1.2.a. Comparaison des N-glycosylpeptides de fibroblastes en phase exponentielle de croissance ou quiescents.

Dans le cas des fibroblastes BHK-21 ou NIH 3T3 en croissance active (Fig. 56 et Tableau XVII), le fractionnement sur Concanavoline A immobilisée révèle une plus grande proportion de structures N-glycosidiques présentant une grande affinité pour la Concanavoline A (FEC 0,5M) au détriment des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique (FEC 10mM) par rapport à ces mêmes cellules cultivées à confluence.

Tableau XVII : Répartition après fractionnement sur Ultrogel ACA 202 et sur ConA-Sepharose des N-glycosylmembranaires de fibroblastes en fonction de leur état de croissance et en fonction de la radioactivité totale de départ.

BHK-21	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
EXPO	49%	11%	31%
PLATEAU	49%	18%	14%

NIH 3T3	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
EXPO	52%	7%	7%
PLATEAU	52%	11%	3%

II.3.1.2.b. Comparaison des N-glycosylpeptides de fibroblastes normaux en fonction des phases du cycle cellulaire.

Après un blocage par la sulfo-vinblastine, l'enrichissement en phase mitotique des fibroblastes BHK-21 (Fig. 57A) ou NIH 3T3 (Fig. 58C) permet de confirmer les résultats obtenus avec les mêmes cellules

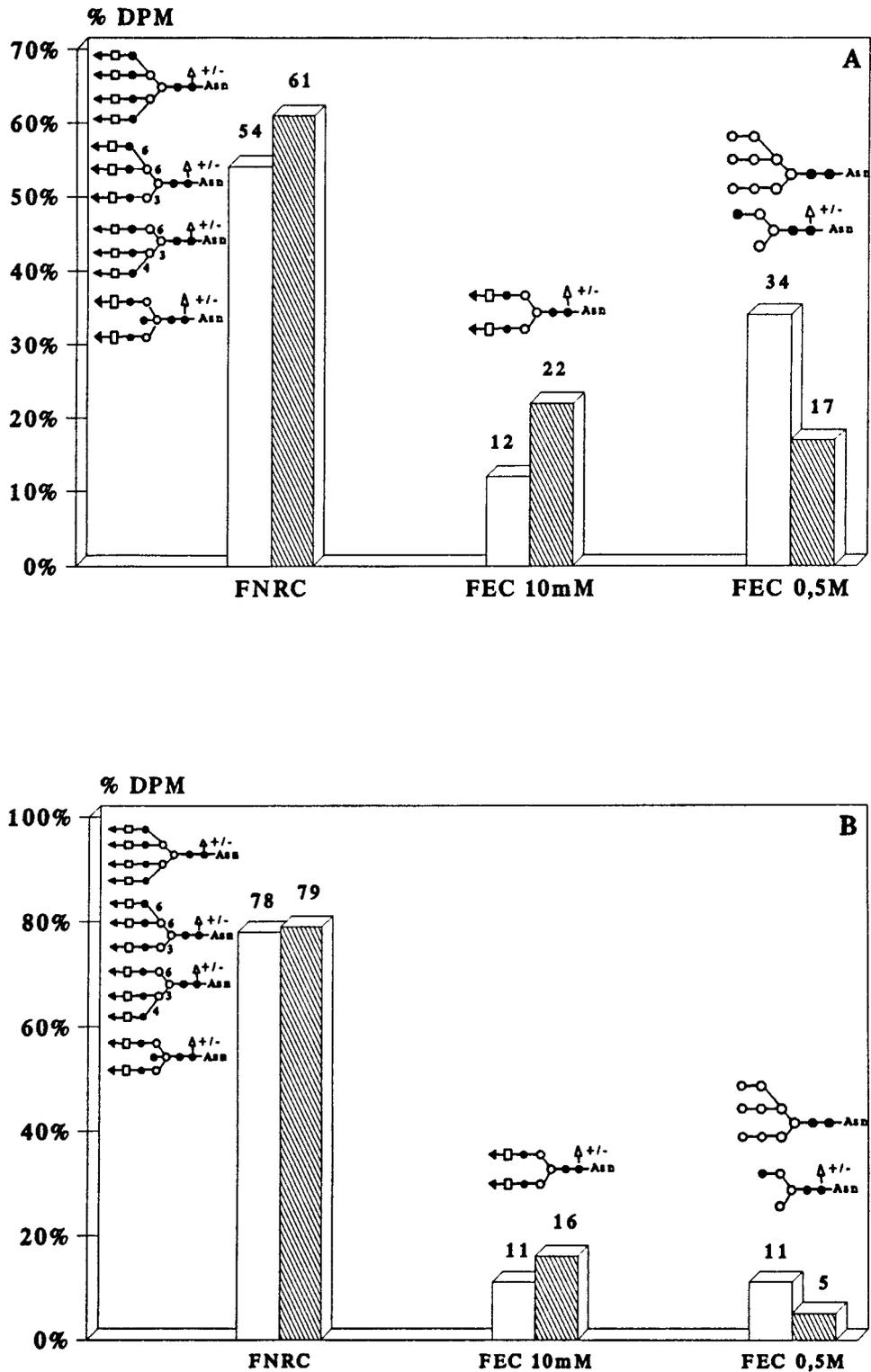


Figure 56 : Histogrammes représentant la répartition des N-glycopeptides membranaires de fibroblastes BHK-21 (A) et NIH 3T3 (B) en phase exponentielle de croissance (□) comparées aux mêmes cellules cultivées à confluence (▨) obtenue par fractionnement sur ConA-Sepharose.

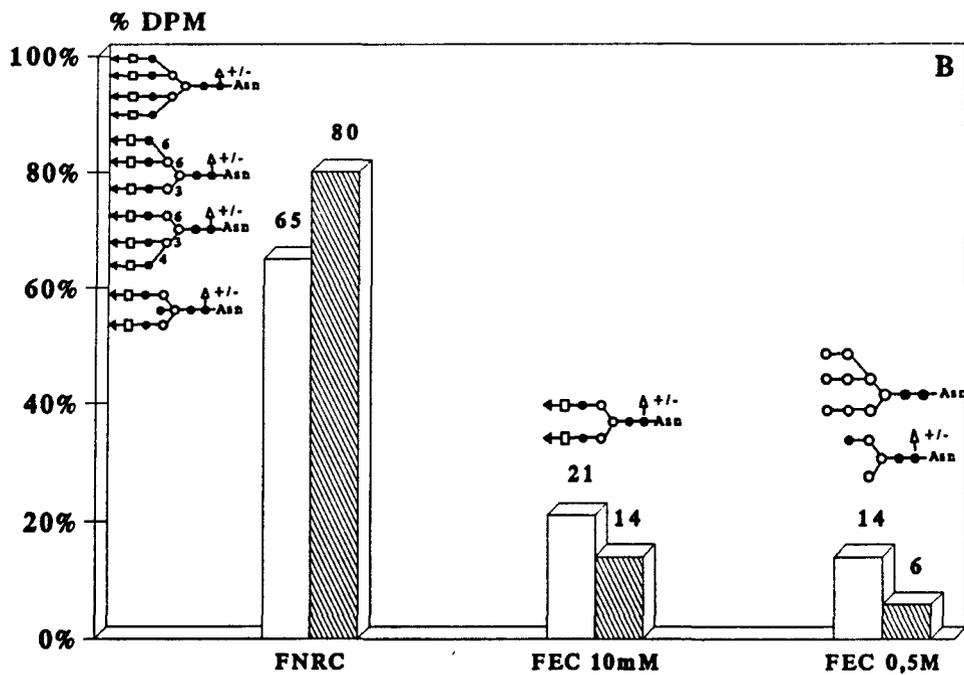
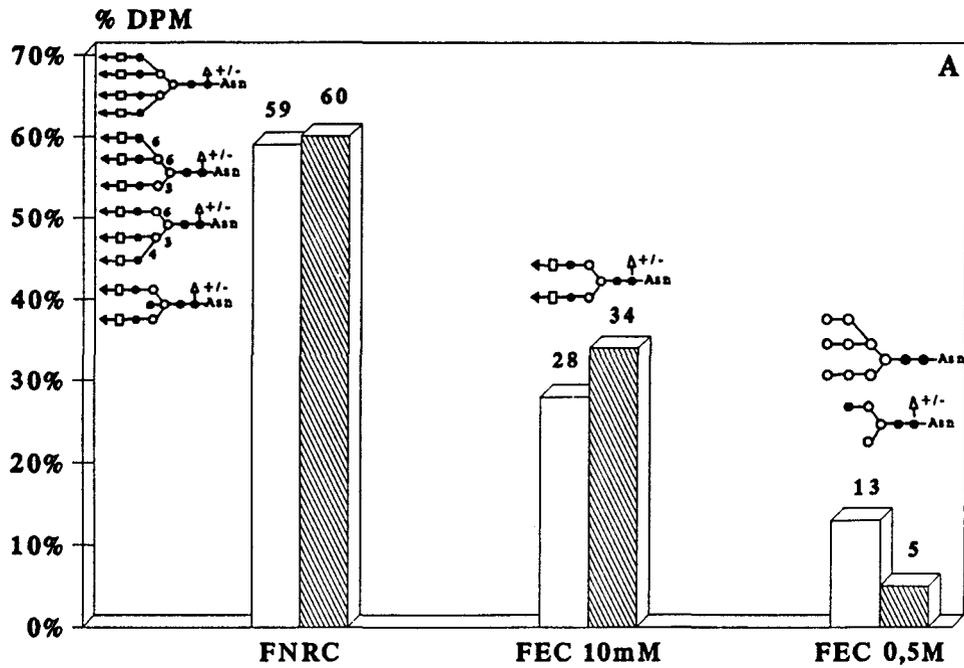


Figure 57 : Histogrammes représentant la répartition, après fractionnement sur Concanavaleine A-Sepharose, des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes normaux BHK-21 (A) et transformés HSV (B) enrichis en phase mitotique après un blocage par la vinblastine sulfate (□) et comparés aux mêmes cellules enrichies en phase G₀/G₁ par culture à confluence (▨).

en phase exponentielle de croissance : ces cellules renferment plus de structures oligomannosidiques et biantennées immatures que les mêmes cellules cultivées à confluence. Cette augmentation s'effectue parallèlement à une diminution des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique matures.

Par contre, des populations cellulaires enrichies en phase S par double blocage par la thymidine (Fig. 58A) ou en phase G₂ par action du Hoechst 33342 (Fig. 58B) ne présentent pas de modifications significatives au niveau de ces différentes populations de N-glycosylpeptides (voir également le tableau XVIII), par rapport aux cellules cultivées à confluence.

Tableau XVIII : Répartition après fractionnements sur Ultrogel ACA 202 et sur ConA-Sepharose des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes en fonction des différentes phases du cycle cellulaire.

BHK-21	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
VINBLASTINE G1/S/G2M 4/11/85%	53%	25%	12%
PLATEAU G1/S/G2M 58/19/13%	56%	32%	5%

NIH 3T3	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
PLATEAU G1/S/G2M 65/24/11%	55%	11%	3%
THYMIDINE G1/S/G2M 13/72/15%	62%	11%	5%
HOECHST G1/S/G2M 15/53/32%	61%	15%	5%
VINBLASTINE G1/S/G2M 3/3/94%	60%	10%	12%

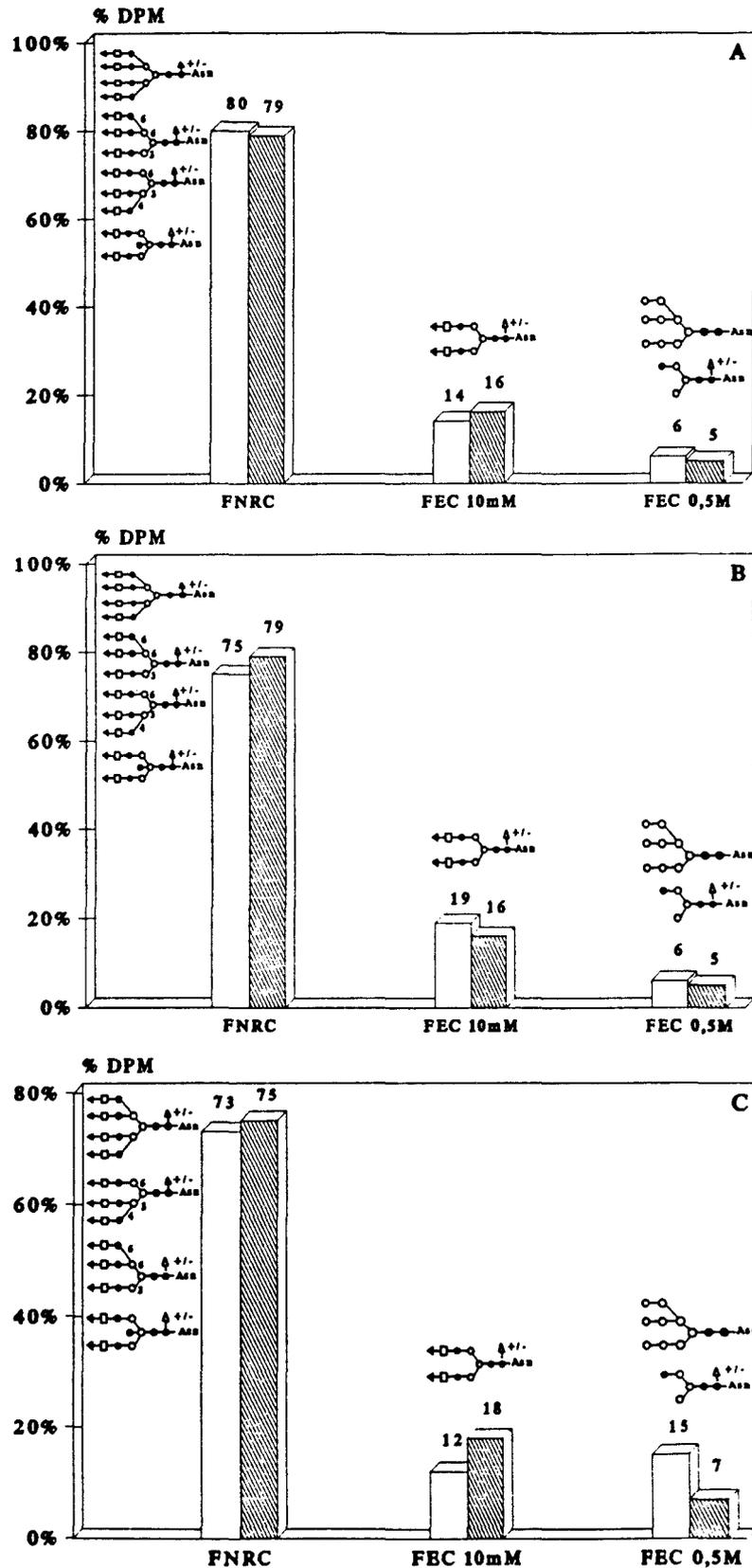


Figure 58 : Histogrammes représentant la répartition, après fractionnement sur Concanavalline A-Sepharose, des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes NIH 3T3 enrichis en phase S suite à un double blocage par la thymidine (A, □), en phase G₂ par action du Hoechst 33342 (B, □) ou en phase mitotique après un blocage par la vinblastine sulfate (C, □) et comparés dans les trois cas par des cellules enrichies en phase G₀/G₁ par culture à confluence (▨).

II.3.1.2.c. Comparaison des N-glycosylpeptides de fibroblastes transformés en fonction des phases du cycle cellulaire.

Les fibroblastes transformés, comme les HSV (Fig. 57B) ou NIH ras (Fig. 59A) bloqués en phase mitotique voient également leurs structures oligomannosidiques et biantennées incomplètes (FEC 0,5M) augmenter, mais, cette fois, l'enrichissement semble s'effectuer au détriment des structures de type N-acétyllactosaminique plus complexes de la fraction non retenue. De plus, la population de structures biantennées de type N-acétyllactosaminique (FEC 10mM) augmente également au détriment de celle des glycanes tri- et tétraantennés.

Ce phénomène se retrouve, quoique moins prononcé, lorsque sont comparés les N-glycosylpeptides des fibroblastes NIH ras bloqués par de la vinblastine sulfate aux N-glycosylpeptides des mêmes cellules enrichies en phase S (Fig. 59B) ou en phase G₂ (Fig. 59C) : augmentation de toutes les fractions renfermant des glycanes fortement retenus par la ConA au détriment des structures glycaniques non retenues. Ces variations sont également exprimées dans le tableau XIX.

II.3.1.3. Conclusions.

Les fractionnements des N-glycosylpeptides membranaires par chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose mettent en évidence, dans les cellules en croissance, une plus grande proportion de structures glycaniques présentant une grande affinité envers la lectine.

Un enrichissement en cellules mitotiques confirme ces résultats mais sans toutefois les amplifier.

Dans des populations de cellules normales (BHK-21 et NIH 3T3), cette augmentation dans les proportions de glycanes de type

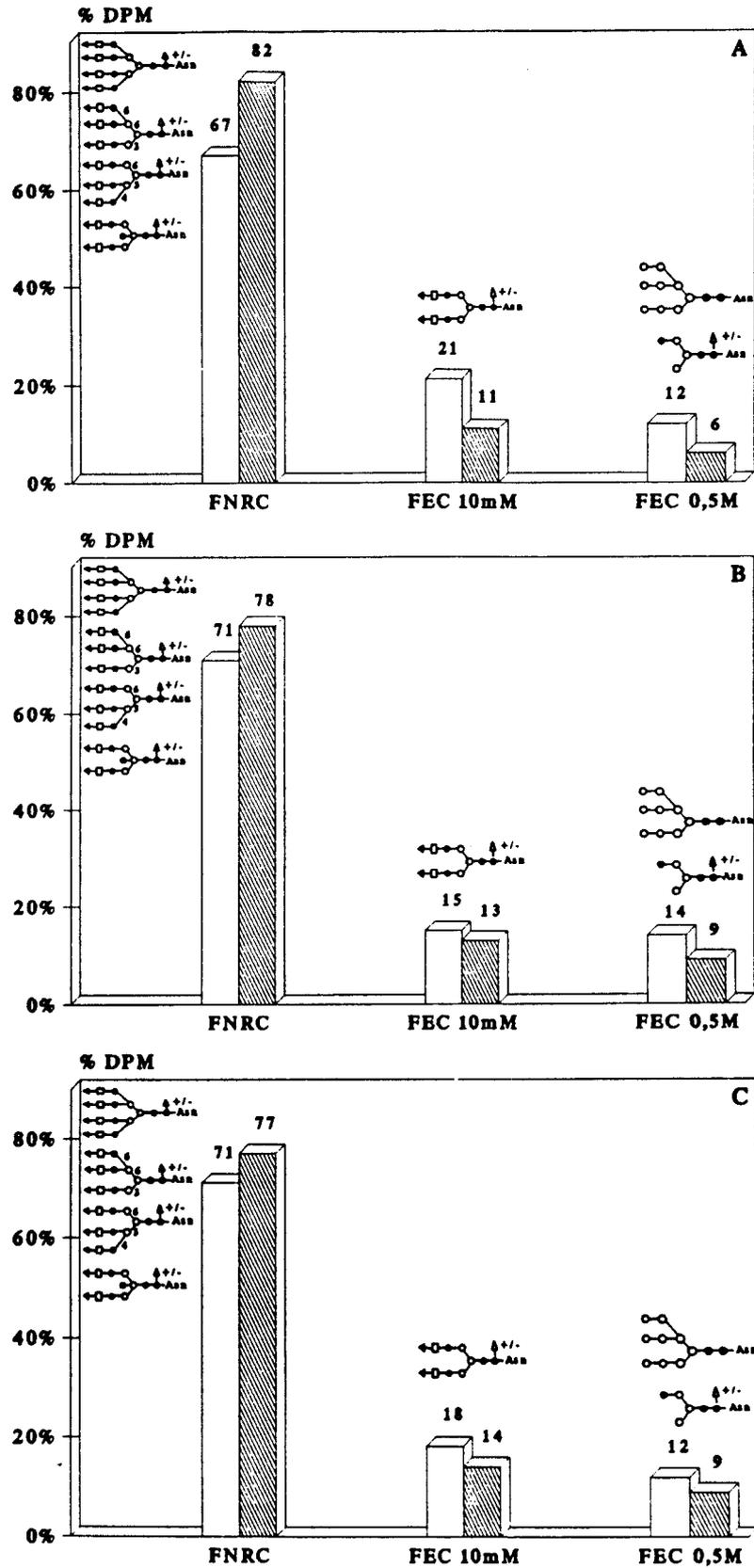


Figure 59 : Histogrammes représentant la répartition, après fractionnement sur Concanavalline A-Sepharose, des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes NIH ras enrichis en phases G₀/G₁ par culture à confluence (A, ▨), en phase S après double blocage par la thymidine (B, ▩) ou en phase G₂ par action du Hoechst 33342 (C, ▩) et comparés, dans les trois cas, à ces mêmes cellules enrichies en phase mitotique par de la sulfo-vinblastine (□).

Tableau XIX : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes transformés en fonction des phases du cycle cellulaire et en référence à la radioactivité totale de départ.

HSV	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
VINBLASTINE G1/S/G2M 15/10/75%	54%	17%	12%
PLATEAU G1/S/G2M 50/30/20%	66%	12%	5%

NIH ras	FNRC	FEC 10mM	FEC 0,5M
PLATEAU G1/S/G2M 70/20/10%	66%	9%	5%
THYMIDINE G1/S/G2M 32/48/20%	65%	11%	7%
HOECHST G1/S/G2M 32/22/46%	69%	12%	8%
VINBLASTINE G1/S/G2M 4/18/78%	62%	16%	10%

oligomannosidique fortement retenus (FEC 0,5M) s'effectue au détriment des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique (FEC 10mM).

Par contre, dans les cellules transformées (HSV et NIH ras), cet enrichissement s'effectue au détriment des structures de type N-acétyllactosaminique plus complexes de la fraction non retenue (FNRC). Le taux de structures biantennées est également en légère augmentation dans les cellules mitotiques.

II.3.2. Chromatographie d'affinité sur lectine de lentille immobilisée.

II.3.2.1. Mode opératoire.

Les fractions obtenues sur Concanavalline A-Sepharose sont dessalées sur Biogel P2, concentrées, puis reprises par 500 μ l de PBS pour être injectées sur une colonne de LCA-silice (voir chapitre sur la HPLC d'affinité, p. 133). L'injection s'effectue à un débit de 0,2ml/min et des fractions de 4ml sont collectées. L'élution est réalisée par de l'éthylènediamine 20mM (pH=9) à un débit de 2ml/mn.

Pour chaque fraction injectée, deux sous-fractions sont obtenues : une fraction non retenue (FNRL) correspondant, dans le cas de la FNRC, aux structures tétraantennées de type N-acétyllactosaminique, aux structures triantennées en β -1,4, aux structures tri'-antennées en β -1,6 non fucosylées sur l'osamine du point d'attache ainsi qu'aux structures biantennées à glucosamine intercalaire non-fucosylées. Les structures biantennées de type N-acétyllactosaminique (FEC 10mM) non-fucosylées sur l'osamine du point d'attache ne sont pas reconnues par la lectine de lentille. De même, dans la dernière fraction (FEC 0,5M), les structures de type oligomannosidique ne présentent pas d'affinité pour cette lectine ainsi que les structures de type N-acétyllactosaminique biantennées incomplètes et non fucosylées sur la glucosamine du point d'attache.

Les structures N-acétyllactosaminiques tri'-antennées, biantennées à glucosamine intercalaire ou biantennées, ainsi que des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique incomplètes, fucosylées sur l'osamine du point d'attache interagissent avec la lectine de lentille immobilisée et sont éluées par une solution d'éthylènediamine 20mM (FEL 20mM).

En résumé, cette lectine permet principalement de mettre en évidence une activité accrue de l'activité enzymatique responsable du branchement de résidus fucose en α -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache.

II.3.2.2. Résultats.

II.3.2.2.a. Comparaison des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes en phase exponentielle de croissance ou quiescents.

Après incorporation de glucosamine ^3H ou ^{14}C par les fibroblastes BHK-21 ou NIH 3T3, le fractionnement sur lectine de lentille immobilisée des N-glycosylpeptides non retenus sur ConA (FNRC) ne fait apparaître aucune différence dans les deux sous-populations obtenues entre cellules en multiplication rapide ou cellules quiescentes (Fig. 60).

Dans le cas des structures biantennées (FEC 10mM), les différents états de croissance engendrent assez peu d'hétérogénéité. Il n'est, en effet, détecté de différences qu'entre les types cellulaires : les structures des BHK-21 sont retenues, en moyenne, à 75% par la LCA contre 40% pour celles des NIH 3T3. Ainsi, ce deuxième fractionnement n'apporte pas d'éléments nouveaux dans notre étude des N-glycosylpeptides : le double fractionnement (ConA + LCA) illustré par la figure 61 ne permet pas de relier la glycosylation des glycanes de type N-acétyllactosaminique et, plus particulièrement, la fucosylation en α -1,6 sur la première osamine, au déroulement de la croissance des fibroblastes BHK-21 et NIH 3T3. Nous ne retrouvons que le déficit en structures biantennées dans les cellules en phase exponentielle de croissance.

Quant aux structures fortement retenues sur ConA (FEC 0,5M) de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique biantenné incomplet, elles ont des comportements chromatographiques différents

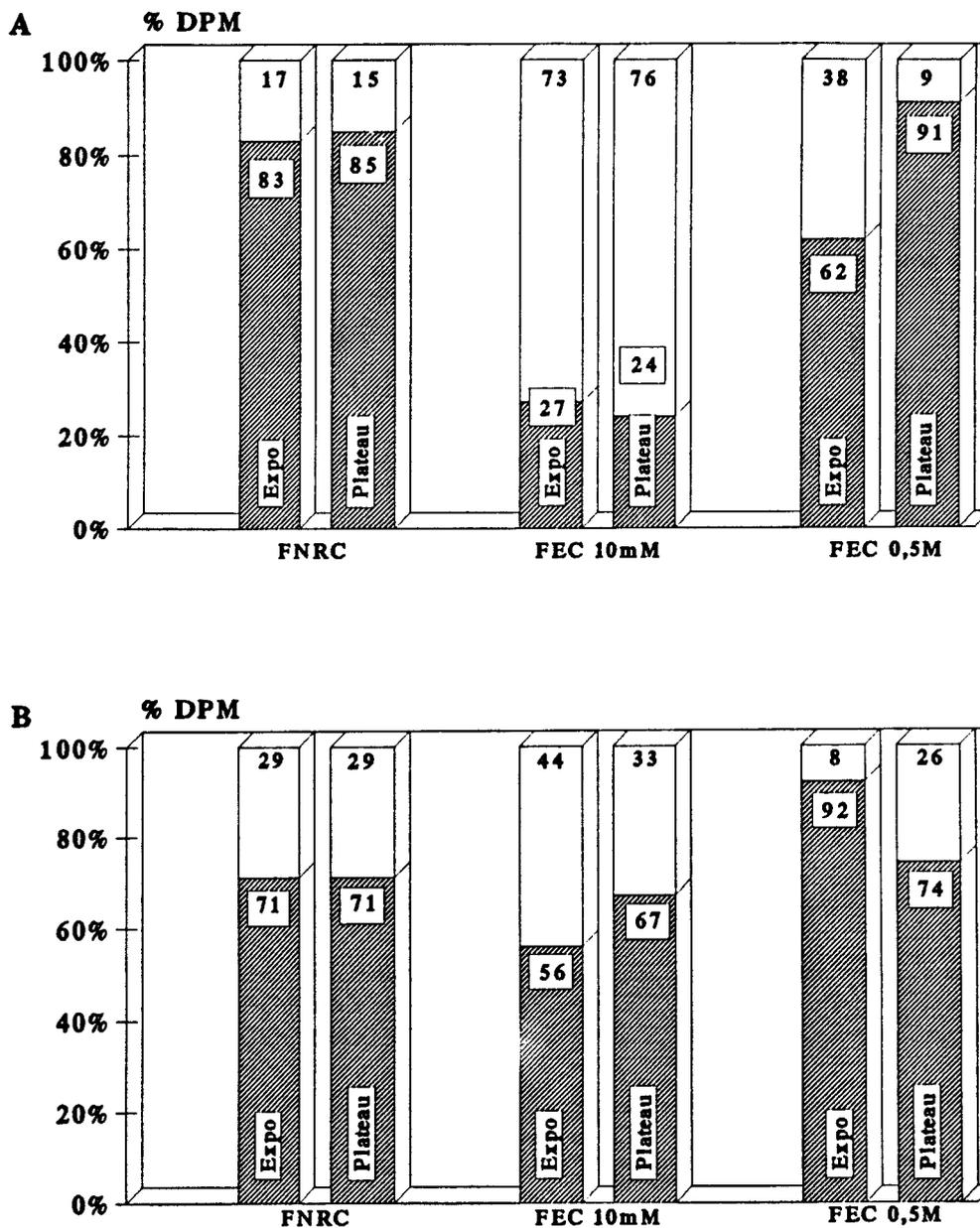


Figure 60 : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes BHK-21 (A) et NIH 3T3 (B), à différents états de croissance, après fractionnement sur LCA-silice : chaque fraction obtenue lors du passage sur ConA-Sepharose en donne deux nouvelles : une fraction non-retenue (FNRL, ) et une fraction éluée par de l'éthylène diamine 20mM (FEL 20mM, ) .

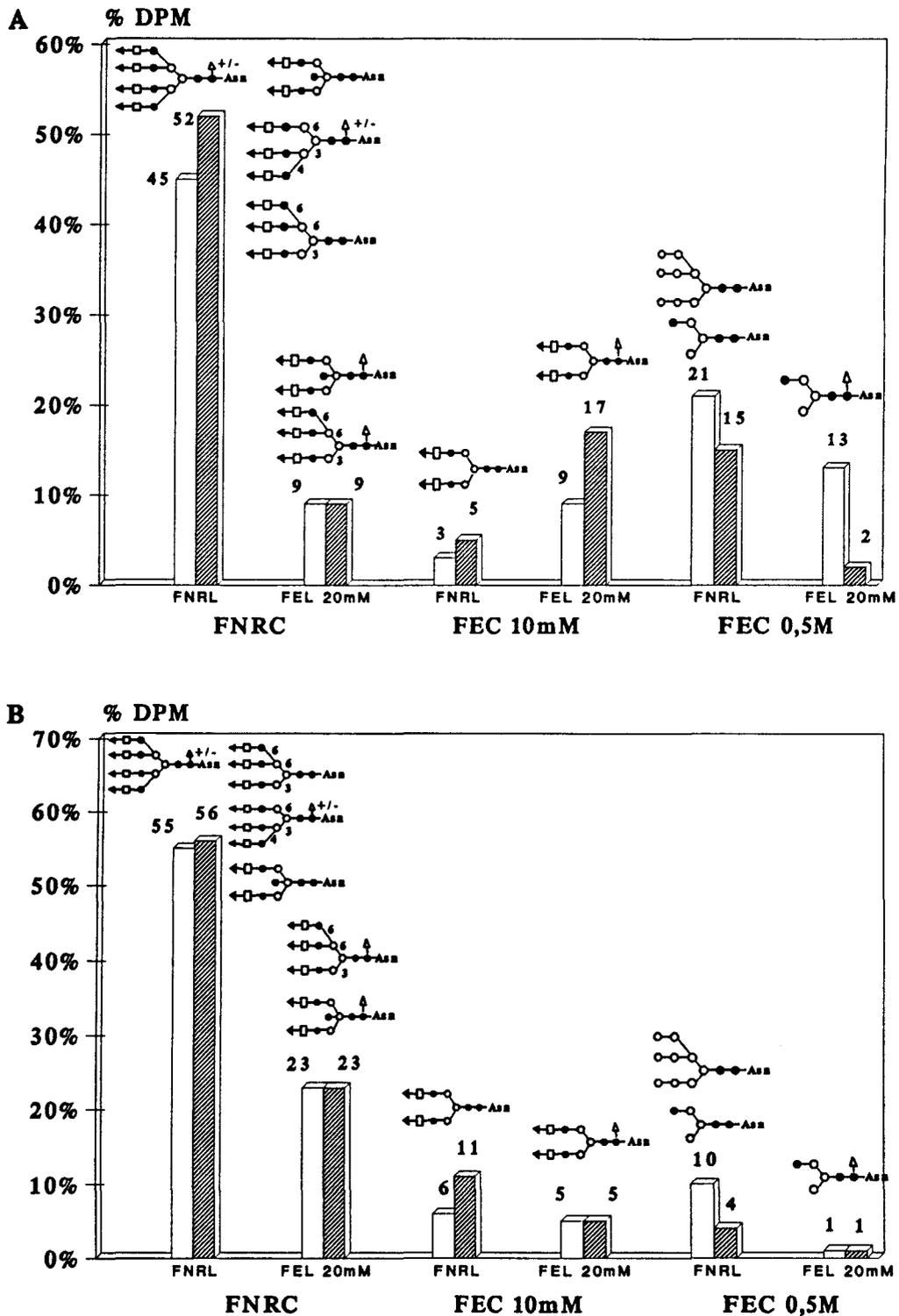


Figure 61 : Histogrammes représentant la répartition des N-glycosyl-peptides membranaires de fibroblastes BHK-21 (A) et NIH 3T3 (B), marqués à la glucosamine ³H et ¹⁴C, en phase exponentielle de croissance (□) ou cultivées à confluence (▨) après fractionnement sur ConA-Sepharose, puis sur LCA-silice.

sur LCA selon l'état de croissance des cellules : en général les BHK-21 en phase exponentielle sont plus riches en structures fucosylées sur leur osamine du point d'attache que les cellules en plateau tardif, alors que le phénomène apparaît inversé dans les NIH 3T3.

Le tableau XX résume les différences obtenues entre BHK-21 et NIH 3T3 : un fort taux de structures fortement retenues pour la ConA et fucosylées sur la glucosamine du point d'attache pour les BHK-21 en phase exponentielle, alors que des différences minimales sont remarquées entre les fractions retenues (FEC 0,5M et FEC 10mM) pour les NIH 3T3.

Tableau XX : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes en fonction de leur état de croissance et en fonction de la radioactivité totale de départ fractionnée successivement sur ACA 202 puis sur ConA-Sepharose et LCA-silice.

	BHK-21		NIH 3T3	
	EXPO G1/S/G2M 35/33/32%	PLATEAU G1/S/G2M 85/10/5%	EXPO G1/S/G2M 40/28/32%	PLATEAU G1/S/G2M 65/22/13%
FNRC-FNRL	41%	42%	37%	37%
FNRC-FEL 20mM	8%	7%	15%	15%
FEC 10mM-FNRL	3%	4%	4%	7%
FEC 10mM-FEL 20mM	8%	14%	3%	4%
FEC 0,5M-FNRL	19%	13%	6%	2%
FEC 0,5M-FEL 20mM	12%	1%	<1%	<1%

II.3.2.2.b. Comparaison des N-glycosylpeptides de fibroblastes normaux ou transformés en phases mitotique et G_1/G_0 .

α) Fibroblastes normaux BHK-21 :

Afin de permettre une meilleure mise en évidence d'une éventuelle différence de fucosylation, nous avons marqué les glycanes des

fibroblastes BHK-21 par incorporation de fucose ^3H ou ^{14}C et comparé les N-glycosylpeptides membranaires de ces cellules bloquées en phase mitotique par de la vinblastine sulfate ou cultivées à confluence (Fig. 62A).

Nous n'avons pas décelé de différences notables en ce qui concerne les structures biantennées et n'avons enregistré qu'une légère modification des proportions des autres structures.

Des représentations plus générales de ces résultats : répartition des N-glycosylpeptides après un double fractionnement ConA-LCA des N-glycosylpeptides (Fig. 63A) ou des glycanes totaux de départ après chromatographie de gel-filtration, puis d'affinité sur lectines (tableau XXI), ne permettent pas de différencier notablement les phases G_0/G_1 et M des BHK-21 en fonction de leur état de glycosylation.

Il apparaît globalement que des cellules à métabolisme réduit (G_0/G_1) sont plus riches en structures biantennées fucosylées que lorsqu'elles sont en métabolisme accéléré (blocage par la vinblastine) et que ces proportions s'inversent pour les structures biantennées incomplètes fucosylées.

Quant aux structures "plus lourdes" de la fraction non retenue sur ConA (FNRC), l'activité de fucosylation est légèrement plus importante dans les cellules en mitose.

B) Fibroblastes transformés HSV :

Un marquage classique des N-glycosylpeptides membranaires par incorporation de glucosamine ^3H ou ^{14}C ne révèle pas de différences notables de fucosylation de ces structures par fractionnement sur LCA immobilisée (Fig. 62B) : comme dans le cas des BHK-21 normaux, les structures fortement retenues sur ConA se comportent différemment

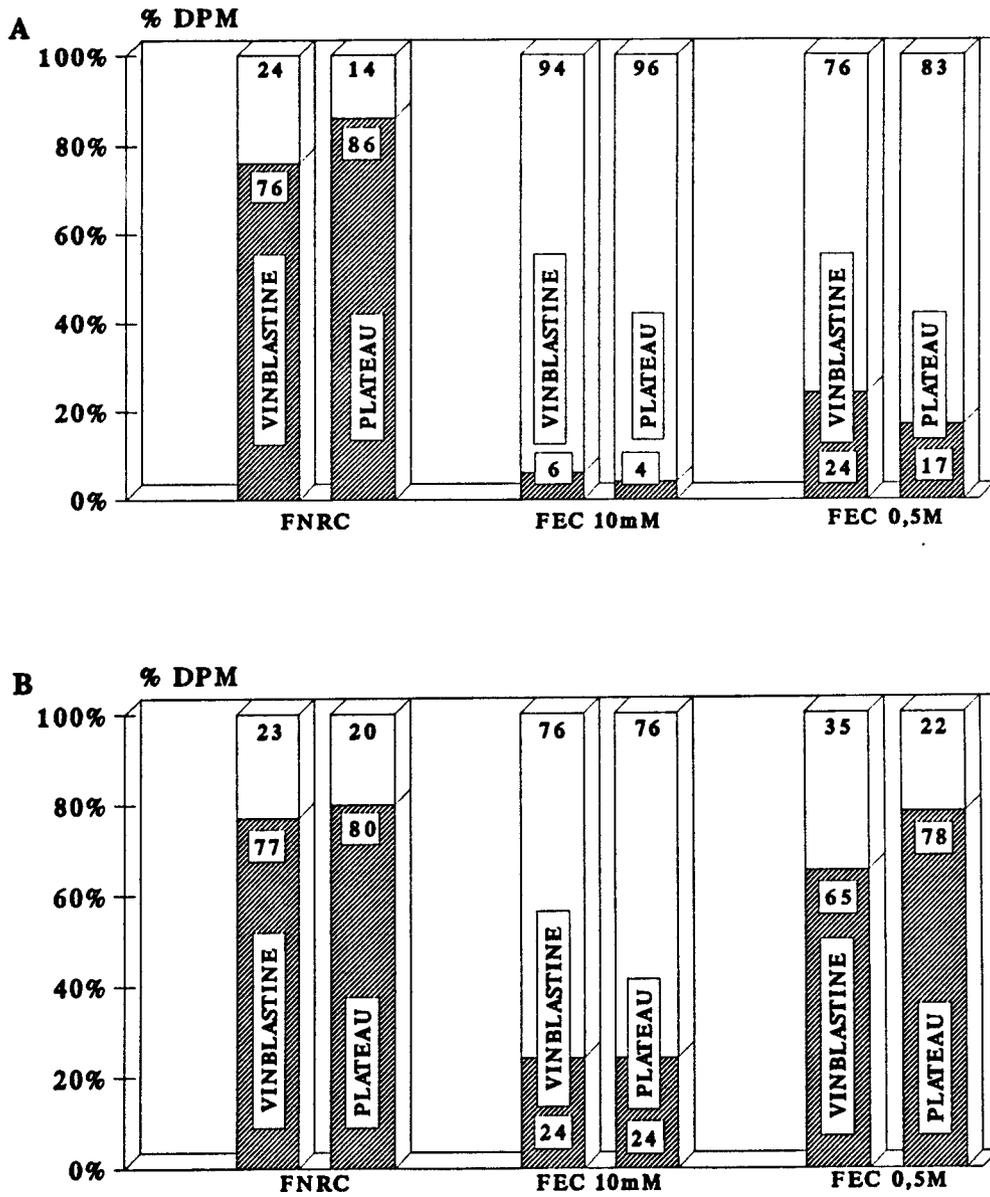


Figure 62 : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes normaux BHK-21 (marquage par le fucose) (A) ou transformés HSV (marquage par la glucosamine) (B) bloqués par de la vinblastine sulfate ou cultivés à confluence après fractionnement sur LCA-silice. Chaque fraction obtenue lors du passage sur ConA-Sepharose en donne deux nouvelles : une fraction non-retenue (FNRL, ) et une fraction éluee par de l'éthylènediamine 20mM (FEL 20mM, ) .

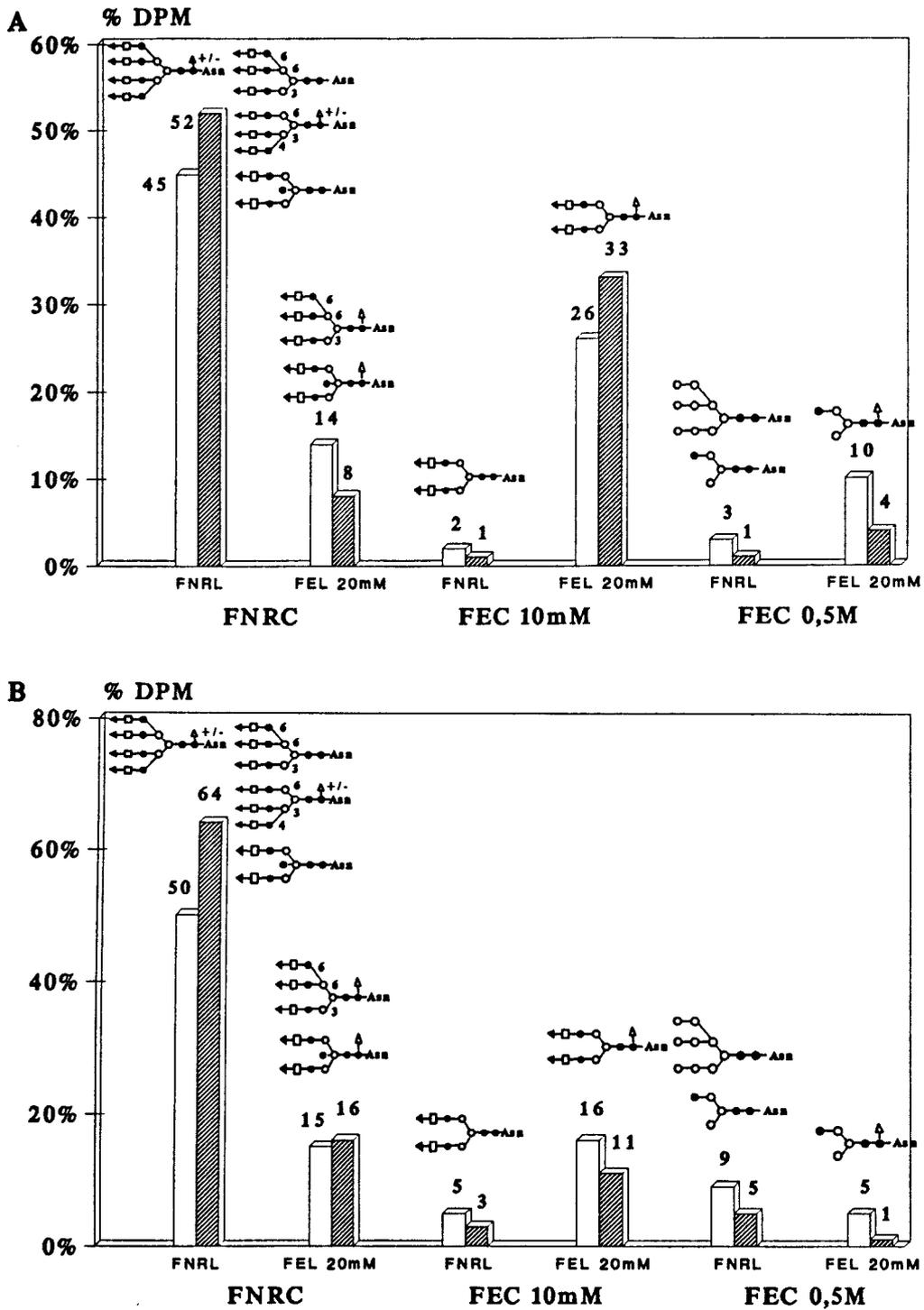


Figure 63 : Histogrammes représentant la répartition des N-glycosyl-peptides membranaires de fibroblastes normaux BHK-21 (marquage par le fucose) (A) et transformés HSV (marquage par la glucosamine) (B) bloqués par de la vinblastine sulfate (□) ou cultivés à confluence (▨) après fractionnement sur ConA-Sepharose, puis sur LCA-silice.

Tableau XXI : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes BHK-21 et HSV bloqués en métaphase ou cultivés à confluence et en fonction de la radioactivité totale de départ, fractionnés successivement sur ACA 202 puis ConA-Sepharose et LCA-silice.

	BHK-21		HSV	
	VINBLASTINE G1/S/G2M 4/11/85%	PLATEAU G1/S/G2M 58/19/13%	VINBLASTINE G1/S/G2M 15/10/75%	PLATEAU G1/S/G2M 50/30/20%
FNRC-FNRL	40%	48%	42%	53%
FNRC-FEL 20mM	13%	8%	12%	13%
FEC 10mM-FNRL	2%	1%	4%	3%
FEC 10mM-FEL 20mM	24%	31%	13%	9%
FEC 0,5M-FNRL	3%	<1%	8%	4%
FEC 0,5M-FEL 20mM	9%	4%	4%	1%

suivant la phase du cycle étudiée, mais ce comportement est minime et inversé : les cellules au métabolisme plus actif (blocage par la vinblastine) forment plus de structures biantennées incomplètes mais fucosylées, que lorsqu'elles sont au repos.

Une représentation générale du fractionnement des N-glycosylpeptides sur ConA et LCA (Fig. 63B) ou des glycanes totaux (tableau XXI) sur ACA 202 puis ConA/LCA immobilisées ne peut permettre de lier leur métabolisme au cycle, nous pouvons juste déceler une légère dominance des structures biantennées (fucosylées ou non) ou oligomannosidiques dans les cellules mitotiques au détriment des structures lourdes.

La notion de cellule en métabolisme actif ou au repos n'est pas parfaitement traduisible en terme de glycosylation dans ce cas-ci.

II.3.2.2.c. Comparaison des N-glycosylpeptides membranaires de cellules normales ou transformées, enrichies dans les différentes phases du cycle cellulaire.

α) Fibroblastes normaux NIH 3T3 :

La figure 64 est caractérisée par un appauvrissement des structures fucosylées biantennées matures dans les cellules cultivées à confluence, alors que ces dernières sont enrichies en glycanes biantennés incomplets et fucosylés fortement affines pour la ConA.

Par contre, aucune différence n'est enregistrée dans les fractions complexes non retenues sur ConA.

Lorsque nous tenons compte de la répartition des différentes structures N-glycosylpeptidiques après fractionnements successifs sur ConA et LCA (Fig. 65) ou de la répartition de la totalité des glycopeptides de départ, y compris les protéoglycannes, (tableau XXII), les légères différences enregistrées n'apparaissent plus, surtout dans le cas les cellules en interphase. Seules les cellules bloquées en mitose présentent une légère prédominance dans la plupart des sous-fractions reconnues par la ConA.

Tableau XXII : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes NIH 3T3 bloqués dans les différentes phases du cycle cellulaire, en fonction de la radioactivité totale de départ, fractionnée successivement sur ACA 202, ConA-sepharose et LCA-silice.

NIH 3T3	PLATEAU G1/S/G2M 65/24/11%	THYMIDINE G1/S/G2M 13/72/15%	HOECHST G1/S/G2M 15/53/32%	VINBLASTINE G1/S/G2M 3/3/94%
FNRC-FNRL	40%	46%	49%	47%
FNRC-FEL 20mM	11%	16%	12%	13%
FEC 10mM-FNRL	7%	6%	7%	3%
FEC 10mM-FEL 20mM	4%	5%	8%	7%
FEC 0,5M-FNRL	3%	5%	5%	9%
FEC 0,5M-FEL 20mM	1%	<1%	<1%	3%

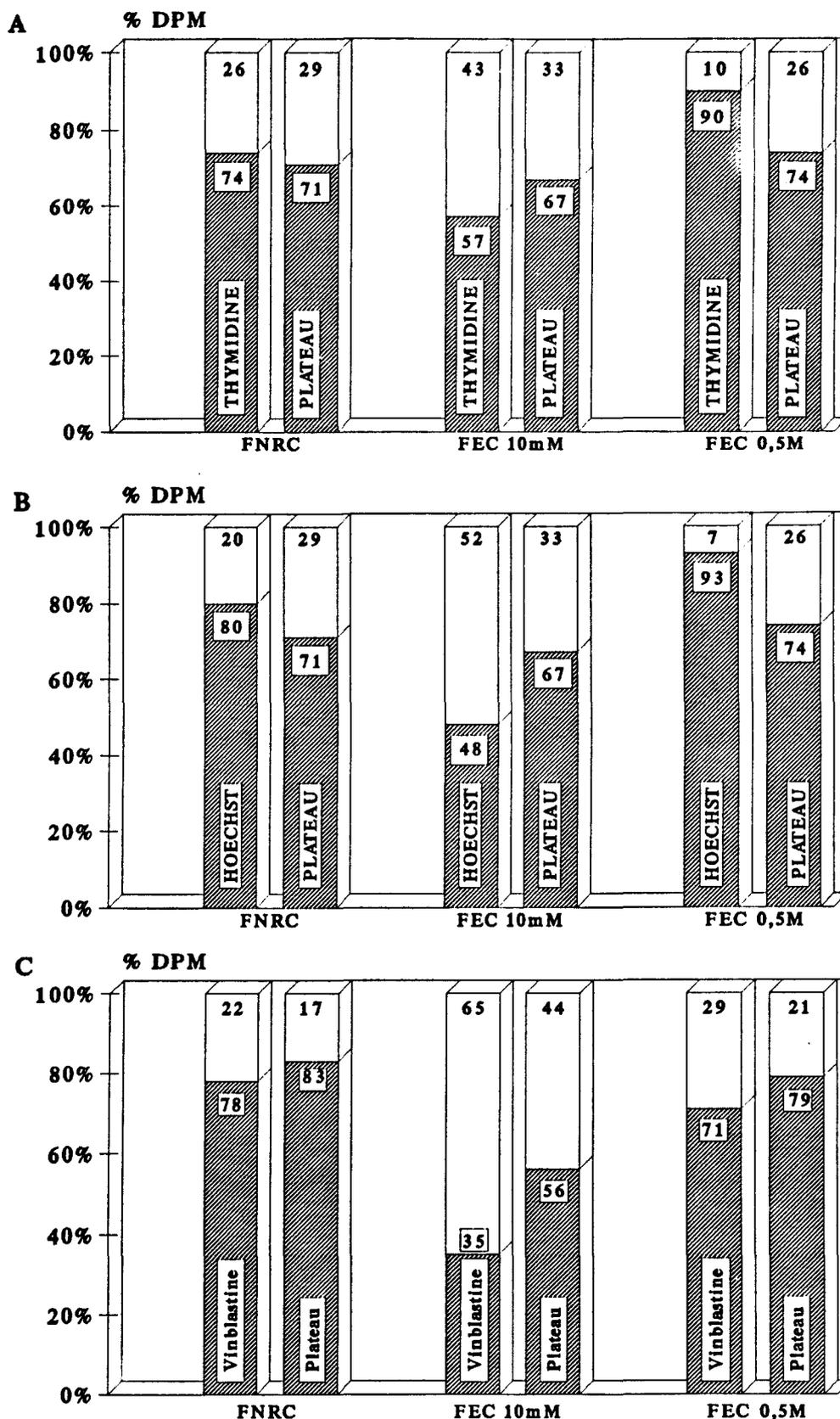


Figure 64 : Répartitions des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes NIH 3T3, marqués par de la glucosamine ^3H ou ^{14}C , après fractionnements sur LCA-silice. Ces fibroblastes ont été bloqués dans les différentes phases du cycle par les mêmes méthodes que précédemment : culture à confluence, blocages par la thymidine (A), par le Hoechst (B) et par la vinblastine (C). Chaque fraction obtenue lors du passage sur ConA-Sepharose en donne deux nouvelles : une première fraction non-retenue (FNRL, ) et une autre fraction éluee par de l'éthylènediamine 20mM (FEL 20mM, ) .

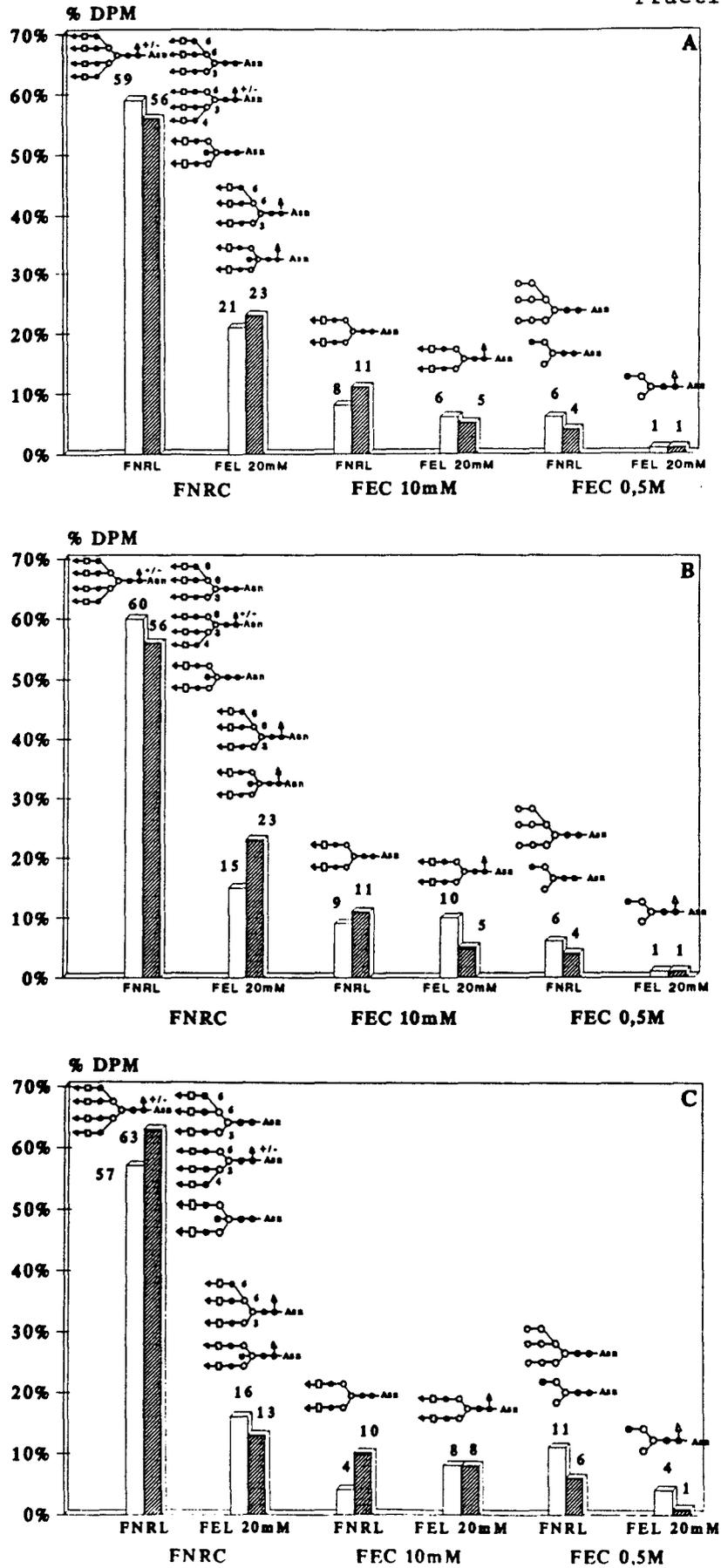


Figure 65 : Histogrammes représentant la répartition des N-glycosyl-peptides membranaires de fibroblastes NIH 3T3, marqués par de la glucosamine ^3H ou ^{14}C , après fractionnement sur ConA puis LCA. Ces fibroblastes ont été enrichis en différentes phases du cycle par : culture à confluence pour la phase G0/G1 (▨), double blocage par la thymidine (A, □) pour la phase S, blocages par la thymidine et le Hoechst (B, □) pour la phase G2, blocage par la vinblastine (C, □) pour la phase mitotique.

B) Fibroblastes transformés NIH ras :

La figure 68 résume les différents fractionnements sur LCA de glycopeptides de cellules transformées. Elle montre une légère augmentation de la quantité de structures retenues par la LCA par rapport aux cellules normales, notamment dans les fractions reconnues par la ConA. Les cellules en mitose comportent un plus grand nombre de structures biantennées fucosylées que les cellules en interphase.

L'allure plus générale de la répartition des structures N-glycanniques après le double fractionnement ConA/LCA (Fig. 67) ou de la totalité des structures (tableau XXIII) nous laissent penser que le cycle cellulaire n'engendre pas de différences de la glycosylation de surface des cellules transformées et que seules les fractions reconnues par la ConA et la LCA des cellules bloquées par la vinblastine sont légèrement enrichies en structures fucosylées.

Tableau XXIII : Répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes transformés NIH ras bloqués dans les quatre phases du cycle cellulaire et en fonction de la radioactivité totale de départ, fractionnés successivement sur ACA 202, puis ConA-Sepharose et LCA-silice.

NIH ras	PLATEAU G1/S/G2M 70/20/10%	THYMIDINE G1/S/G2M 32/48/20%	HOECHST G1/S/G2M 32/22/46%	VINBLASTINE G1/S/G2M 4/18/78%
FNRC-FNRL	55%	53%	58%	47%
FNRC-FEL 20mM	11%	12%	11%	14%
FEC 10mM-FNRL	4%	5%	7%	6%
FEC 10mM-FEL 20mM	5%	6%	5%	9%
FEC 0,5M-FNRL	3%	5%	6%	6%
FEC 0,5M-FEL 20mM	2%	2%	2%	5%

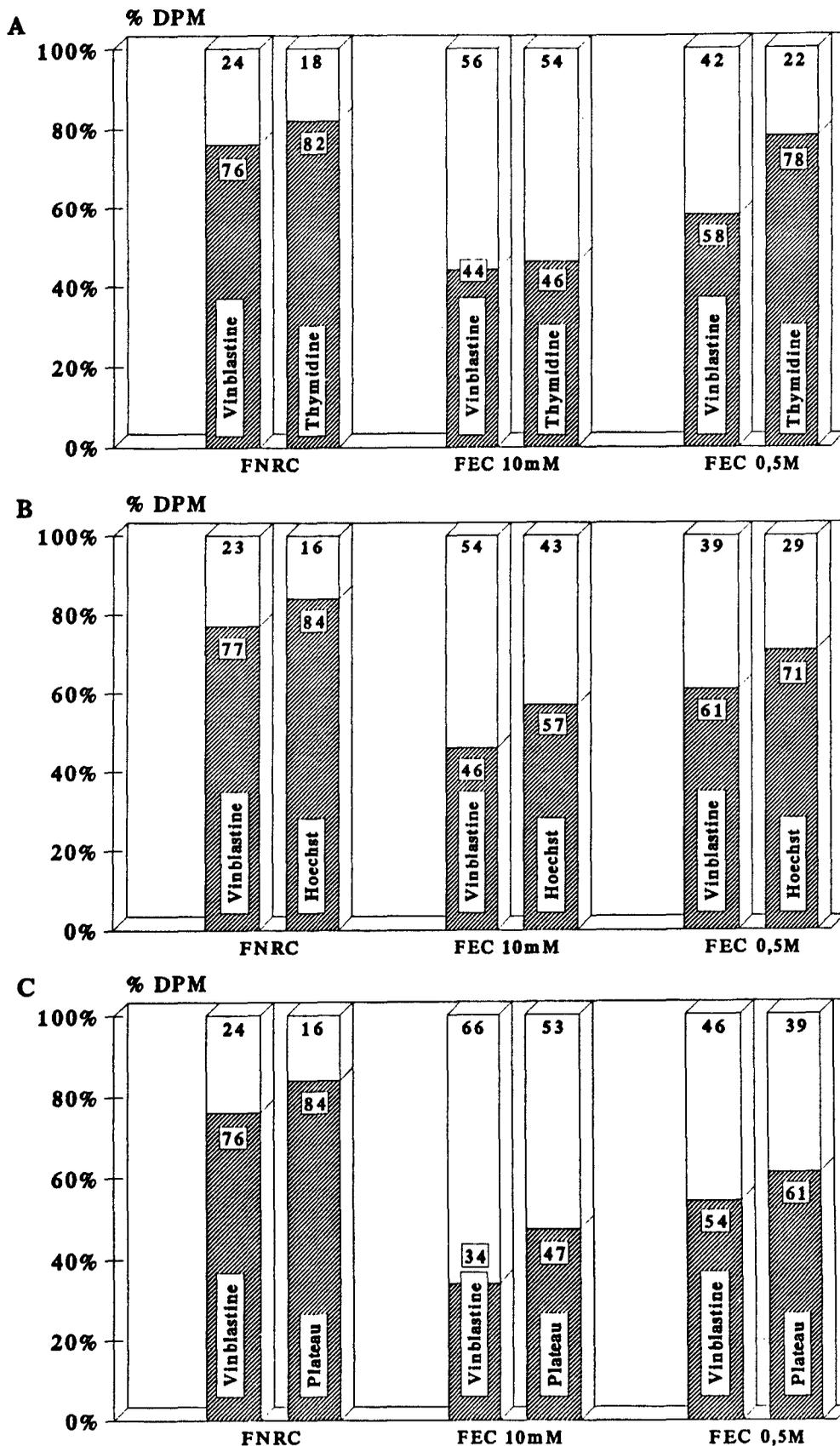


Figure 66 : Répartitions des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes transformés NIH ras, après fractionnement sur LCA-silice. Ces fibroblastes ont été enrichis en différentes phases du cycle par les méthodes décrites précédemment : blocages par la vinblastine, par la thymidine (A), par le Hoechst 33342 (B) et culture à confluence (C). Chaque fraction obtenue lors du passage sur ConA-Sepharose en donne deux nouvelles : une fraction non-retenue (FNRL, ) et une fraction éluee par de l'éthylène diamine 20mM (FEL 20mM, ).

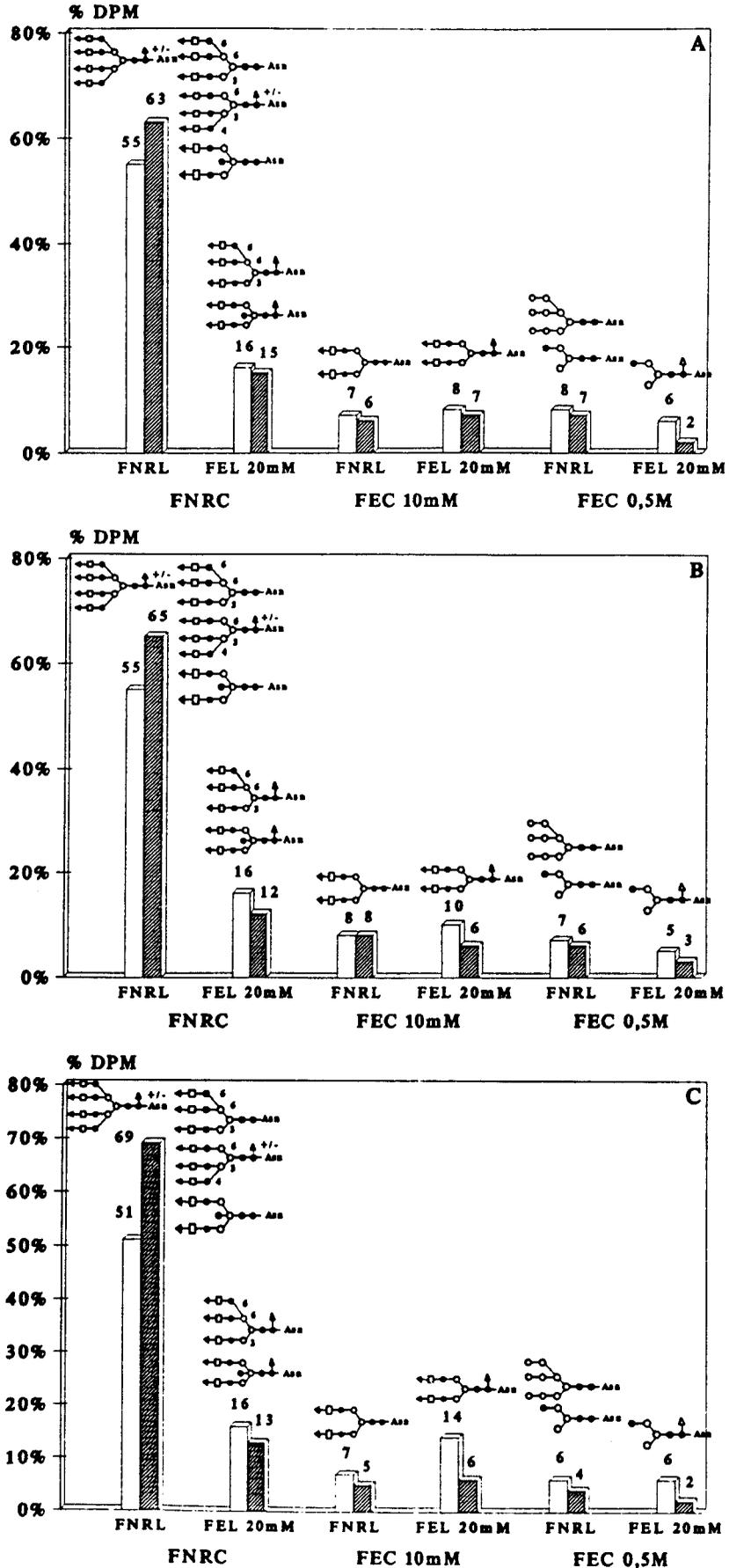


Figure 67 : Histogrammes représentant la répartition des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes transformés NIH ras, après fractionnements sur ConA puis LCA. Ces fibroblastes ont été enrichis en différentes phases du cycle par : blocage par la thymidine (A, ▨) pour la phase S, blocages par la thymidine et le Hoechst 33342 (B, ▨) pour la phase G₂, culture à confluence pour la phase G₀/G₁ (C, ▨) et blocage par la vinblastine sulfate (□) pour la mitose.

II.3.2.3. Conclusions.

Le cas particulier de la fucosylation en α -1,6 sur la glucosamine du point d'attache ne semble pas tributaire d'une quelconque régulation liée aux événements composant le cycle cellulaire.

Les seules différences rencontrées lors des fractionnements sur LCA-silice ne peuvent être mises qu'au crédit de la croissance cellulaire et non du cycle lui-même. De plus ces variations ne se rencontrent pas identiquement dans chaque type cellulaire.

En règle générale le taux de structures fucosylées est plus élevé dans les cellules en croissance ou bloquées en métaphase par rapport aux mêmes cellules en quiescence ou en interphase. Il en est de même pour les fractions fortement retenues par la ConA : présence d'une plus grande quantité de structures fucosylées dans les cellules en mitose que dans les cellules en interphase. L'activité de l' α -1,6 fucosyltransférase semble donc augmentée dans les cellules en mitose, mais cette activation est trop légère pour pouvoir la lier définitivement à la régulation du cycle cellulaire.

II.3.3. Chromatographie d'affinité sur lectine de sureau (SNA-I) immobilisée.

II.3.3.1. Mode opératoire.

Les fractions glycopeptidiques préparées à partir des fibroblastes NIH 3T3 ou NIH ras et susceptibles de contenir des structures sialylées (FNRC et FEC 10mM retenues ou non sur LCA) sont dessalées sur Biogel P2, concentrées par évaporation et reprises par 500 μ l de PBS. Les analyses sont effectuées sur une colonne de SNA-silice (voir chapitre sur la HPLC d'affinité) à un débit de 0,2ml/mn et des fractions de 4ml sont collectées.

La fraction non-retenue (FNRS) renferme les structures non-sialylées et/ou les structures sialylées en α -2,3.

La fraction éluée par une solution de lactose 0,3M dans du PBS renferme des N-glycosylpeptides présentant au moins un résidu d'acide sialique en α -2,6.

II.3.3.2. Résultats.

II.3.3.2.a. Fibroblastes normaux NIH 3T3 :

La figure 68 montre clairement que la sialylation en α -2,6 des structures tri- et tétraantennées de fibroblastes NIH 3T3 ne subit pas de régulation dépendante du cycle cellulaire. En effet, les fractions retenues par la SNA sont presque toutes de l'ordre de 10% et seule celle

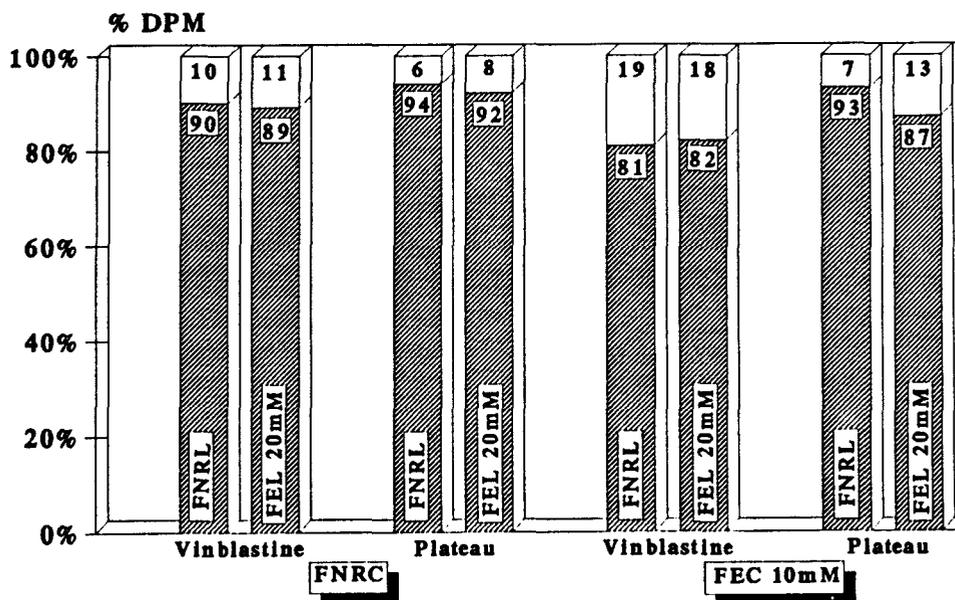


Figure 68 : Répartition, après fractionnement sur SNA-silice, des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes NIH 3T3 bloqués par de la vinblastine sulfate ou cultivés à confluence. Après passage sur ConA et LCA, chaque fraction en donne deux nouvelles : une première fraction non-retenue (FNRS, ) et une seconde éluée par une solution de lactose 0,3M (FES 0,3M, ) .

contenant les structures biantennées de type N-acétyllactosaminique de cellules bloquées en métaphase voit sa valeur doubler.

Dans le cas de cellules BHK-21 (non représenté), le résultat est le même : aucune différence n'est perceptible et, dans chaque cas, la lectine ne retient que moins de 5% des structures.

II.3.3.2.b. Fibroblastes transformés NIH ras :

En comparant les histogrammes des fractions issues de cellules à différentes phases du cycle, nous ne pouvons déceler de différences dans leur comportement chromatographique sur SNA immobilisée. Toutefois, les fractions retenues sur LCA ont un taux de sialylation en α -2,6 supérieur par rapport aux fractions non retenues (Fig. 69).

II.3.3.3. Conclusions.

La sialylation en α -2,6 des structures de type N-acétyllactosaminique bi- et tri'-antennées n'est pas dépendante d'une régulation associée au cycle cellulaire.

La comparaison des figures 68 et 69 nous permet cependant de remarquer que le taux des structures reconnues par la SNA est beaucoup plus important dans les cellules transformées (NIH ras) que dans les cellules normales (NIH 3T3).

II.3.4. Estimation du degré de sialylation des structures biantennées de type N-acétyllactosaminique.

II.3.4.1. Mode opératoire.

Les fractions contenant les glycopeptides biantennés (FEC 10mM) sont dessalées sur Biogel P2, concentrées et reprises par 300 μ l d'eau. Les solutions sont déposées sur une feuille de papier Whatman n°3 ainsi que des témoins biantennés sialylés et non-sialylés (témoins provenant

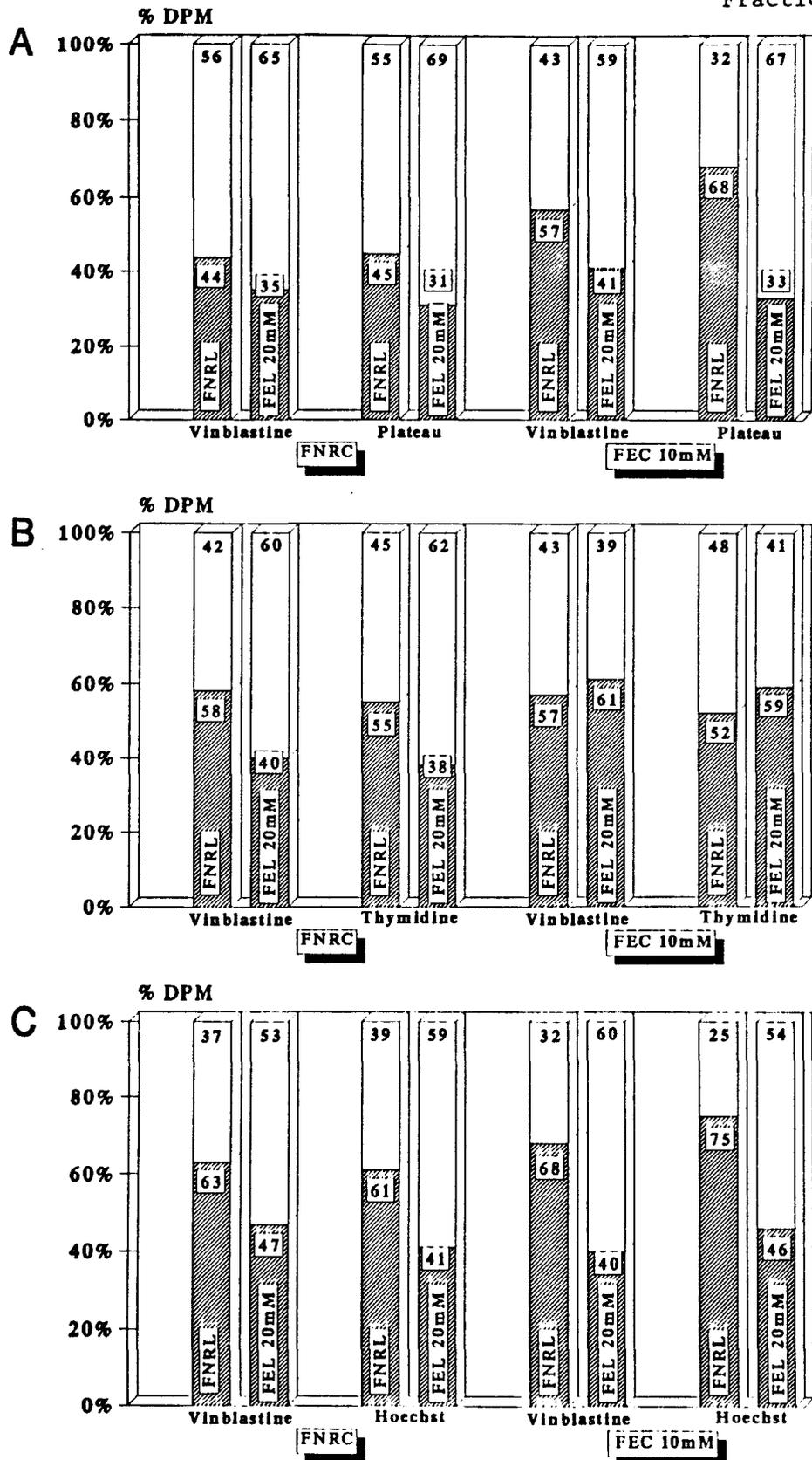


Figure 69 : Répartition après fractionnement sur SNA-silice, des N-glycosylpeptides membranaires de fibroblastes transformés NIH ras cultivés à confluence et comparés à des cellules bloquées par de la vinblastine sulfate (A), par de la thymidine (B) ou par du Hoechst 33342 (C). Après passage sur ConA puis LCA, chaque fraction en donne deux nouvelles : une fraction non-retenue (FNRS,) et une fraction éluée par une solution de lactose 0,3M (FES 0,3M,).

d'un hydrolysate pronasique de fibrinogène déjà utilisés en HPLC d'affinité (p. 121)). La migration se déroule 12h sous une tension de 330v (50mA) dans un tampon pyridine/acide acétique (5/1) dilué à 20% dans l'eau. La feuille est ensuite séchée, puis découpée en bandes de 1cm. Ces dernières sont éluées et la radioactivité de l'éluat est comptée.

II.3.4.2. Résultats.

Comme le montre la figure 70, il n'apparaît pas d'hétérogénéité de sialylation sur les glycanes biantennés totaux (FEC 10mM) de cellules BHK-21 en phase exponentielle de croissance et en plateau tardif.

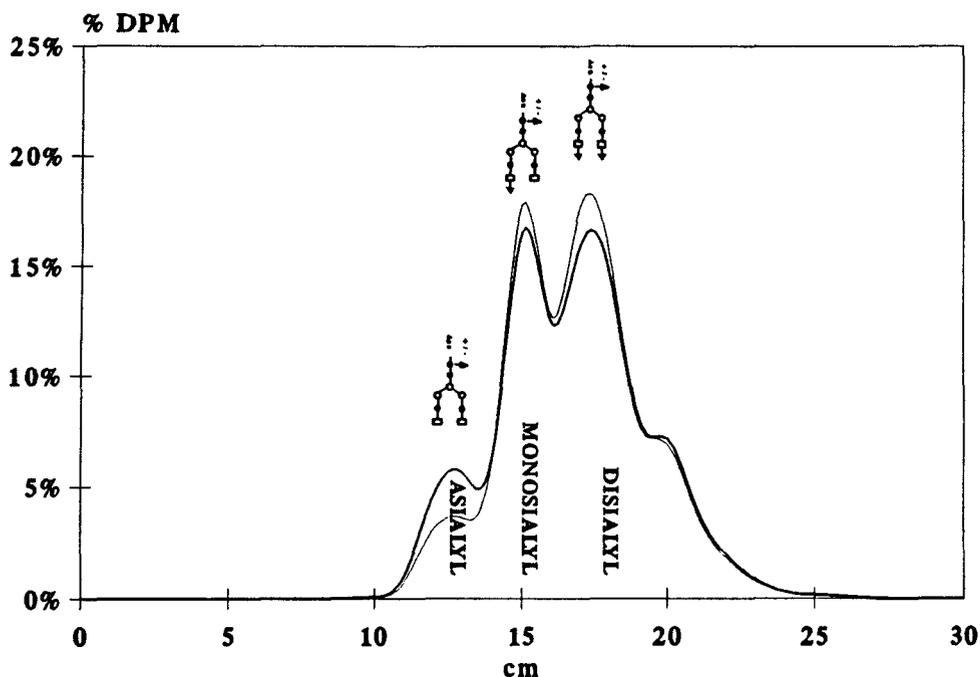


Figure 70 : Migration électrophorétique des glycopeptides biantennés totaux (FEC 10mM) de cellules BHK21 en phase exponentielle de croissance (—) et cultivées à confluence (—).

Les pourcentages de structures sialylées indiqués dans le tableau XXIV ne présentent pas de variations dépendantes de la croissance cellulaire. Les valeurs entre parenthèses tiennent compte de la

proportion réelle des structures biantennées dans l'ensemble des glycosylpeptides.

La différence (augmentation de la sialylation des biantennés de cellules à confluence) apparaissant dans ces deuxièmes valeurs n'étant vraisemblablement due qu'à une différence du taux de structures biantennées, donc à une plus grande quantité de substrat pour les sialyltransférases.

Tableau XXIV : Séparation par électrophorèse de structures biantennées membranaires de fibroblastes suivant leur sialylation et en fonction de leur état de croissance.

BHK-21 (FEC 10mM)	Phase exponentielle G1/S/G2M 35/33/32%	Plateau tardif G1/S/G2M 85/10/5%
Biantennés non sialylés	14% (2%)	10% (2%)
Biantennés monosialylés	65% (7%)	69% (12%)
Biantennés disialylés	21% (2%)	21% (4%)
	86% (9%)	90% (16%)

D'autres fibroblastes, comme NIH 3T3 et NIH ras (Tableau XXV), n'offrent pas de variations dans la sialylation de leurs structures biantennées non retenues sur SNA (FEC 10mM-FNRS) et ces glycopeptides présentent la même mobilité électrophorétique en cas de blocage par la vinblastine sulfate et de culture à confluence (Fig. 71).

II.3.4.3. Conclusion.

Les différentes phases du cycle de cellules normales ou transformées ne semblent pas liées à une variation du taux de sialylation de leurs structures biantennées de type N-acétyl-lactosaminique.

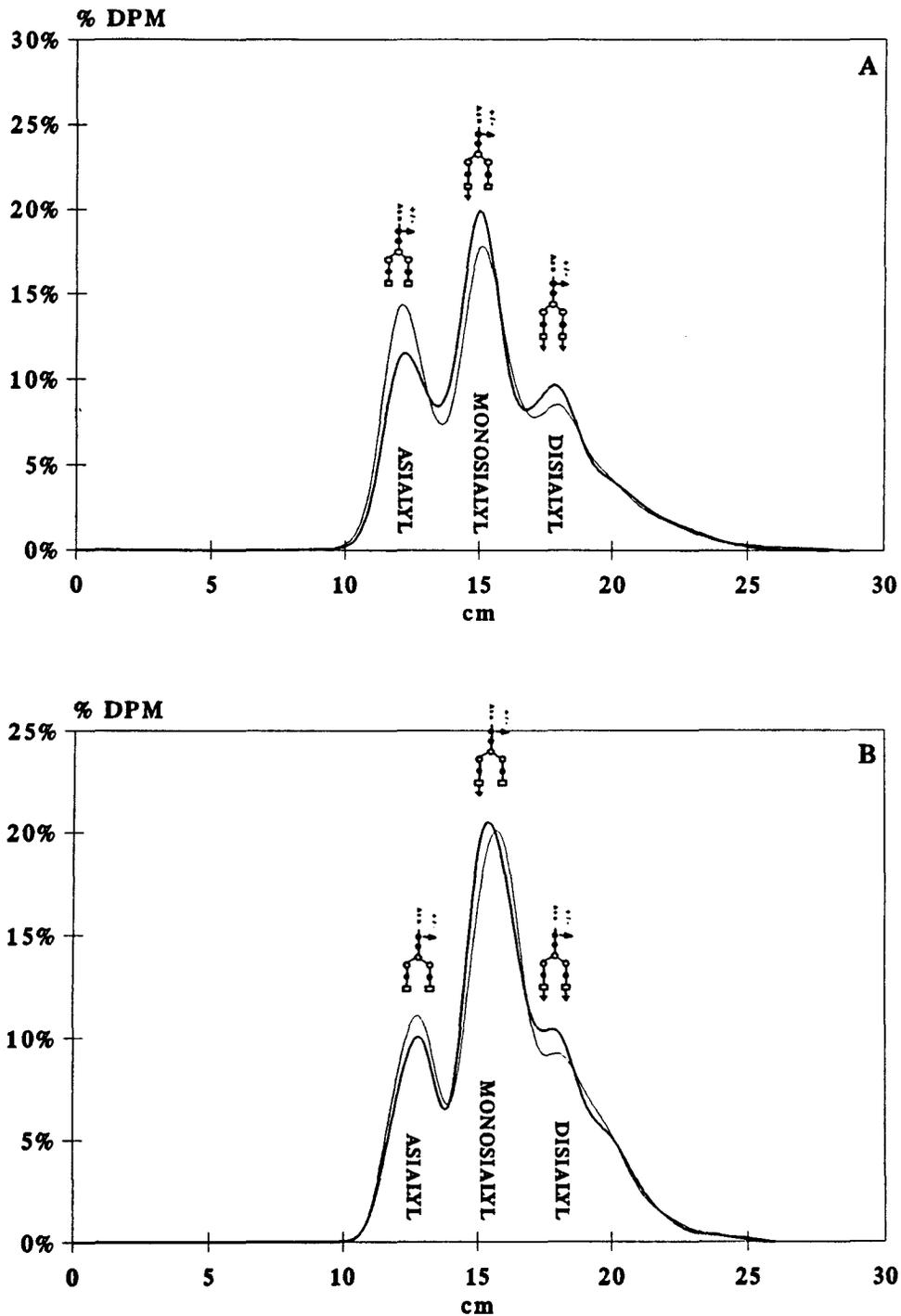


Figure 71 : Migration électrophorétique des glycopeptides biantennés (FEC 10mM, FNRS) de cellules NIH 3T3 (A) et NIH ras (B) bloquées par de la vinblastine sulfatée (—) comparées aux mêmes cellules cultivées à confluence (—).

Tableau XXV : Séparation par électrophorèse de fibroblastes bloqués en métaphase ou cultivés à confluence suivant leur degré de sialylation.

NIH 3T3 (FEC 10mM FNRS)	Blocage vinblastine G1/S/G2M 3/3/94%	Plateau tardif G1/S/G2M 65/24/11%
Biantennés non sialylés	31% (3%)	34% (4%)
Biantennés monosialylés	42% (4%)	40% (4%)
Biantennés disialylés	27% (3%)	26% (3%)
	67% (7%)	66% (7%)

NIH ras (FEC 10mM FNRS)	Blocage vinblastine G1/S/G2M 4/18/78%	Plateau tardif G1/S/G2M 70/20/10%
Biantennés non sialylés	16% (3%)	15% (1%)
Biantennés monosialylés	28% (4%)	30% (3%)
Biantennés disialylés	56% (9%)	55% (5%)
	84% (13%)	85% (8%)

II.3.5. Fractionnement des structures oligomannosidiques.

Après avoir étudié les variations associées aux glycanes de type N-acétyllactosaminique en fonction du cycle cellulaire, nous avons commencé l'étude des structures oligomannosidiques contenues dans les fractions fortement retenues sur Concanavaleine A (FEC 0,5M) et non retenues sur lectine de lentille (FNRL), ces fractions étant celles présentant le plus de variations lors des différentes phases du cycle.

II.3.5.1. Mode opératoire.

Les fractions (FEC 0,5M, FNRL) sont dessalées sur Biogel P2, concentrées et reprises par 250µl d'un tampon citrate 0,05M à pH 5 et décimolaire en NaCl. Les glycanes sont ensuite libérés par 10mU d'endoglycosidase H (Boehringer) durant 18h à 37°C. Cette enzyme hydrolyse la liaison entre les deux glucosamines du noyau pentasaccharidique et libère ainsi des structures oligomannosidiques à



une N-acétylosamine terminale. Une fois l'hydrolyse enzymatique terminée, le tube est chauffé 2mn dans un bain-marie à 100°C pour dénaturer l'enzyme. Le mélange réactionnel est ensuite passé sur une colonne (5ml) de Dowex 1X2 sous forme acétate et équilibrée dans de l'eau. L'éluat obtenu est dessalé sur Biogel P2, concentré et repris dans 100 μ l du mélange acétonitrile/eau (70/30). Après filtration, chaque échantillon est injecté sur colonne Amino (Supelco ; longueur 25cm, diamètre 4,6cm ; diamètre des particules 5 μ m) branchée sur une pompe à gradient Spectra Physics SP8800. Le fractionnement s'effectue grâce à un gradient d'acétonitrile/eau dont les proportions varient de 70/30 à 50/50 en 80mn. Des fractions de 1ml sont collectées et comptées dans un compteur à scintillation LS 6000TA Beckman (liquide scintillant : Aqua Luma plus ; Lumac LSC).

II.3.5.2. Résultats.

Les profils d'élution sont représentés dans la figure 72. Des témoins à deux osamines précédemment injectés (M. Bélard, au laboratoire) permettent de déterminer le contenu de chaque pic principal. Les profils obtenus tiennent compte du décalage occasionné par la présence des deux osamines sur les témoins injectés.

Ces profils mettent en évidence une certaine hétérogénéité de composition en structures oligomannosidiques, surtout pour les cellules transformées par l'oncogène ras, entre des cellules bloquées par la vinblastine et des cellules cultivées à confluence.

II.3.5.3. Conclusion.

Les variations enregistrées semblent assez minimes et nous ne pouvons en tirer de conclusions précises, le marquage par la

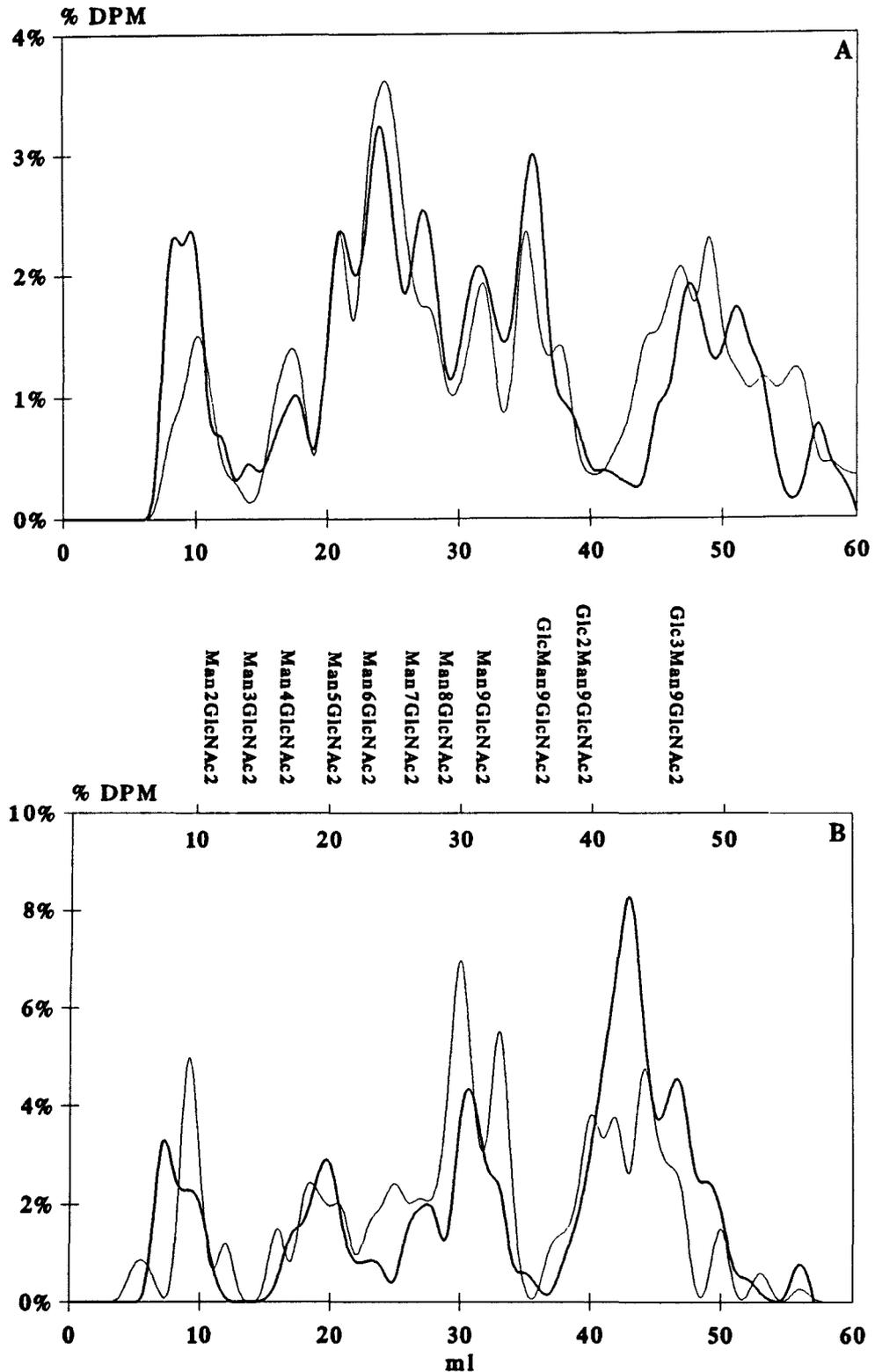


Figure 72 : Profils d'élution, en HPLC sur colonne Amino, de glycannes provenant de la fraction oligomannosidique (FEC 0,5M, FNRL) de cellules NIH 3T3 (A) et NIH ras (B) et libérés de leur partie peptidique par une endoglycannase H. Les cellules étudiées sont bloquées par de la vinblastine sulfate (—) ou cultivées à confluence (—). Des glycannes à deux résidus de N-acétylglucosamine sont employés comme témoins.

glucosamine n'étant pas approprié pour cette étude ; un marquage par du mannose serait plus convainquant pour vérifier une hétérogénéité dans la population oligomannosidique en fonction de l'état de croissance des cellules.

III. CONCLUSIONS.

Les premiers fractionnements effectués ont mis en évidence une évolution dans la constitution des fractions glycopeptidiques membranaires de fibroblastes en fonction de leur état de croissance et ceci à des taux différents suivant les modèles cellulaires. Ces différences s'amplifient lorsque l'on compare des cellules fraîchement activées et d'autres en phase de latence prononcée.

D'autres études nous ont montré que ces variations ne se rencontraient pas dans le cas des structures O-glycosidiques. Nous pouvons donc en conclure que le métabolisme des glycannes des O-glycosylprotéines est indépendant de la régulation du cycle cellulaire.

L'étude plus détaillée des structures N-glycosidiques a mis à jour des différences de proportions dans les fractions contenant les structures oligomannosidiques et N-acétyllactosaminique biantennées incomplètes, ces fractions augmentant dans les cellules en phase exponentielle de croissance, surtout dans les fibroblastes BHK-21, et ceci aux dépens des structures biantennées complètes. De plus, l'utilisation de LCA immobilisée révèle des degrés d'affinité différents de ces dernières fractions vis à vis de cette lectine, ce qui nous incite à attribuer les variations observées aux structures oligomannosidiques.

Une étude plus spécifique de celles-ci a été entamée, mais doit être approfondie.

L'étude particulière de la sialylation des glycanes n'a pas révélé de différences à ce niveau et seules les fractions retenues sur LCA présentent une plus grande affinité pour la SNA. Nous avons surtout mis en évidence d'augmentation du taux de résidus α -2,6NeuAc dans les cellules NIH 3T3 transformées par l'oncogène ras.

Contrairement à ce que nous pouvions penser, l'étude de populations cellulaires bloquées en métaphase n'amplifie pas les phénomènes rencontrés lors des fractionnements de glycopeptides issus de cellules à différents états de croissance. Des lots cellulaires enrichis en phase S ou en phase G_2 ont le plus souvent des comportements chromatographiques voisins des cellules en G_1/G_0 .

Si une régulation du métabolisme des glycanes des N-glycosylprotéines membranaires existe, elle est donc plutôt liée aux phénomènes d'activation, de déclenchement de la croissance cellulaire qu'à une régulation du cycle cellulaire lui même.

CONCLUSIONS /

Les conclusions que nous pouvons tirer d'une manière générale, des résultats obtenus sont les suivantes :

1- Les méthodes de synchronisation que nous avons sélectionnées fournissent des quantités appréciables de cellules marquées, suffisantes pour permettre d'en extraire et fractionner les glycopeptides. Ces protocoles sont de mise en oeuvre facile et donnent des populations cellulaires qui, à défaut d'être entièrement bloquées en une phase précise, présentent des compositions suffisamment différentes pour être comparées. Toutefois, l'emploi d'agents chimiques, susceptibles de modifier le métabolisme des glycoprotéines, nous oblige à interpréter nos résultats avec prudence.

2- L'adaptation de la chromatographie d'affinité classique sur lectines en mode HPLC que nous avons réalisée n'altère pas les propriétés de ces agglutinines qui conservent, dans la quasi-totalité des cas, leurs affinités respectives vis-à-vis des structures glycaniques présentées. Il s'agit d'une technique qui optimise l'utilisation des colonnes de lectines en supprimant les contraintes liées aux supports "mous" et en permettant l'emploi de solvants d'élution non-glucidiques. En outre, elle est beaucoup plus rapide que la méthode classique, les fractions obtenues ont des volumes réduits et les supports chromatographiques sont immédiatement réutilisables.

3- Le fractionnement des glycannes de cellules en fonction de leur situation dans le cycle cellulaire n'ont pas apporté de résultats aussi spectaculaires que nous l'espérions.

Ainsi, la synthèse des O-glycannes ne semble pas modifiée au cours du cycle mitotique. Nous devons toutefois convenir que nous n'en avons réalisé qu'une étude sommaire.

Dans le cas des N-glycosylprotéines, les résultats synthétisés dans le tableau XXVI nous permettent de souligner les points suivants :

a- Dans tous les cas, nous observons des variations en sens inverse de la synthèse des glycannes de type N-acétyllactosaminique et de type oligomannosidique, variations logiques puisque les seconds sont les précurseurs des premiers.

b- Entre cellules en phase exponentielle de croissance et cellules en quiescence (phase G_0), les différences sont très nettes et portent essentiellement sur les glycannes biantennés et les glycannes de type oligomannosidique. Nous pouvons, à cet égard, souligner le fait que les différences dans la glycosylation sont plutôt liées à la croissance des cellules qu'à leur cycle mitotique et qu'il y a plus une "opposition croissance/quiescence" qu'une "opposition entre phases".

La cellule semble ne pas prendre le temps d'achever la synthèse des N-glycosylprotéines pour présenter ainsi à sa surface une plus grande proportion de structures de type N-acétyllactosaminique biantennées ne possédant que des embryons de branches.

c- Quant aux variations de structures glycaniques au cours du cycle mitotique, il apparaît clairement que les phases S et G_2 n'amènent aucune variation structurale, contrairement aux phases G_0 et G_1 initiatrices du cycle et à la phase M par laquelle s'achève ce même cycle.

d- Les variations observées en phases G_0/G_1 et M concernent essentiellement les structures de type N-acétyllactosaminique et de type oligomannosidique. Elles portent aussi sur les structures biantennées à

Tableau XXVI : Synthèse des résultats obtenus par fractionnements successifs sur Ultrogel ACA 202, ConA-Sepharose, puis LCA-silice de N-glycosylpeptides de fibroblastes NIH 3T3 ET BHK-21 à différents états de croissance et à différentes phases du cycle cellulaire. (=, +, - : respectivement stabilité, augmentation ou diminution de la proportion des structures glycaniques décrites).

Cellules en croissance	=	=	--	--	+	+++
Cellules en quiescence	=	=	++	++	-	---
G ₀ /G ₁	+	-	+	+	-	--
S	=	=	=	=	=	=
G ₂	=	=	=	=	=	=
M	-	+	-	-	+	++

glucosamine intercalaire et triantennées fucosylées dont les proportions varient au cours de ces phases.

e- Notre intérêt se porte, en outre, sur les variations observées sur les structures fucosylées qui témoignent de modifications sensibles des activités fucosyltransférasiques, celles-ci semblant plus intenses dans les cellules en mitose.

En conclusion finale, nous pouvons dire que nous sommes conscients de nous être arrêtés à un stade très inachevé de nos recherches. Il serait, en effet, de la plus haute importance de mieux définir les structures glycaniques dont nous n'avons étudié que des mélanges complexes fournis par la chromatographie d'affinité sur lectines, d'étudier les variations de sialylation ainsi que celles, d'une manière générale, des glycosyltransférases désignées par les modifications mêmes des structures glycaniques. Restent aussi à définir d'éventuelles relations entre variations structurales et propriétés biologiques des membranes par la recherche plus spécifique, par exemple, d'antigènes connus et en rapport avec la transformation et la différenciation plus particulièrement.

De plus, nous n'avons étudié que des fibroblastes. Ceux-ci présentant déjà des différences entre-eux, il serait intéressant d'élargir nos recherches à d'autres modèles cellulaires.

Nous n'avons finalement fait que jeter les bases de recherches futures. En effet, au terme de plusieurs années de travail, les cellules ne nous ont livré que quelques-uns de leurs secrets, avec parcimonie, et nos résultats n'ont pu qu'en rester (momentanément) fragmentaires.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abe Y. and Ishii S.I. (1990) [Page(s) 112]

High-Performance Affinity Chromatography of Concanavalin A.
Journal of Chromatography, 510, 95-100

Abercrombie M. and Ambrose J.E. (1962) [50]

The surface properties of cancer cells : a review
Cancer Research, 22, 525-548

Adair Jr W.L. and Cafmeyer N. (1987) [81]

Cell-cycle dependence of dolichol phosphate biosynthesis.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 258, 491-497

Al-Bader A.A., Orengo A. and Rao P.N. (1978) [39, 44]

G2 phase -specific proteins of HeLa cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75, 6064-6068

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D. (1983) [51]

In "Molecular Biology of the Cell" ; 298
Médecine-Sciences, Flammarion

Almendral J.M., Huebsch D., Blundell P.A., MacDonald-Bravo H. and Bravo R. (1987) [28]

Cloning and sequence of the nuclear protein cyclin : homology with DNA-binding proteins.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84, 1575-1579

Almendral J.M. et al. (1988) [35]

Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts.
Molecular and Cellular Biology, 8, 2140-2148

Arion D., Meijer L., Brizuela L. and Beach D. (1988) [31]

cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase : evidence for identity with MPF.
Cell, 55, 371-378

Ashwell G. and Morell A.G. (1974) [64]

The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins.

In "Advances in Enzymology", 41, 99

Meister A., Wiley J. ; New York, Academic Press

Aub J.C., Tielsau C. and Lankaster A. (1963) [70]

Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 50, 613-619

Aub J.C., Sanford B.H. and Cote M.N. (1965a) [51, 70]

Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 54, 396-399

Aub J.C., Sanford B.H. and Wang L. (1965b) [51, 70]

Relation of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 54, 400-402

Aubery M. and Bourrillon R. (1975) [75]

Cell growth and thymidine incorporation changes induced by fibroblasts at various stages of differentiation.

Cell Differentiation, 4, 67-77

Aubery M. and Bourrillon R. (1976) [75]

Growth response to lectins in chick embryo cells at different stages of development.

Cell Differentiation, 5, 27-35

B

Barbacid M. (1987) [37]

Ras genes.

Annual Review of Biochemistry, 56, 779-827

Barnes D. and Sato G. (1980) [17]

Serum-free culture : a unifying approach.

Cell, 22, 649-655

Baskin T.I. and Cande W.Z. (1990) [23]

The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants.

Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41, 277-315

Beach D., Durkacz B. and Nurse P. (1982) [31]

Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast.

Nature, 300, 706-709

Berridge M.J. et Irvine R.F. (1984) [19]

Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.

Nature, 312, 315-321

Bertolotti R., Rutishauer N. and Edelman G.M. (1980) [65]

A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cell.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 77, 4831-4835

Bhuyan B.K. (1977) [39]

Cell cycle related cellular lethality.

In "Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells" ; 363-375

Drewinko B. & Humphrey R.M., eds. ; Williams and Wilkins, Baltimore.

Bhuyan B.K., Adams E.G., Badiner G.J. and Trzos R.J. (1987) [39]

Colcemid effects on B16 melanoma cell progression and aberrant mitotic division.

Journal of cellular Physiology, 132, 237-245

Bhuyan B.K. and Grophí V. (1989) [37, 38]

Cell cycle specific inhibitors

Pharmac. Ther., 42, 307-348

Blomhoff H.K., Blomhoff R., Stokke T., De Lange Davies C., Brevik K., Smeland E.B., Funderud S. and Godal T. (1988) [39]

cAMP-mediated growth inhibition of a B-lymphoid precursor cell line reh is associated with an early transient delay in G2/M, followed by an accumulation of cells in G1.

Journal of Cellular Physiology, 137, 583-587

Bodo M., Becchetti E., Pezzetti F., Baroni T., Calvitti M., Alia F.A. and Arena N. (1990) [78]

Cytoskeletal and DNA synthesis modification by concanavalin A in embryonic fibroblasts maintained in serum-free and serum-added medium Cellular and Molecular Biology, 36, 673-687

Boher R. and Beach D. (1988) [31]

Involvement of cdc13 in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe* : possible interaction of the gene product with microtubules.

EMBO Journal, 7, 2321-2327

Boher R.N., Alfa C.E., Hyams J.S. and Beach D.H. (1989) [31]

The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase : regulation of catalytic activity and nuclear localization.

Cell, 58, 485-497

Borchert A., Larsson P.O. and Mosbach K. (1982) [110]

High-performance liquid affinity chromatography on silica-bound Concanavalin A.

Journal of Chromatography, 244, 49-56

Borrebaeck C.A.K., Soares J. and Mattiasson B. (1984) [112]

Fractionation of glycoproteins according to lectin affinity and molecular size using a high-performance liquid chromatography system with sequentially coupled columns.

Journal of Chromatography, 284, 187-192

Bosmann H.B. and Wintson R.A. (1970) [79]

Synthesis of glycoprotein, glycolipid in synchronously L5178Y cells.

Journal of Cell Biology, 45, 23-33

Bouhours D. and Bouhours J.F. (1983) [77]

Developmental changes of hematoside of rat small intestine.
The Journal of Biological Chemistry, 258, 299-304

Bourrillon R. and Aubery M. (1989) [74]

Cell surface glycoproteins in embryonic development.
International Review of Cytology, 116, 257-338

Bozzaro S. (1985) [74]

Cell surface carbohydrates and cell recognition in Dictyostelium.
Cell Differentiation, 17, 67-82

Brent T.P. and Forrester J.A. (1967) [77]

Changes in surface charge of HeLa cells during the cell cycle.
Nature, 215, 92-93

Broekaert W.F., Nsimba-Lubaki M., Peeters B. and Peumans W.J. (1984) [119]

A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark.
Biochemical Journal, 221, 163-169

Bruchowsky N., Owen A.A., Becker A.J. and Till J.E. (1965) [39]

Effects of vinblastine on the proliferative capacity of L cells and their progress through the division cycle.
Cancer Research, 25, 1232-1237

Brugal G. (1976) [87]

Etude de la prolifération cellulaire et de sa régulation chez l'embryon âgé et la jeune larve du triton *Pleurodeles Walthii* Michah. Conception et réalisation d'un système automatique d'analyse microphotométrique des populations cellulaires.

Thèse d'état, Université de Grenoble, 191-247

Brugal G., Garbay C., Giroud F. and Adelh D. (1979) [87]

A double scanning microphotometer for image analysis : hardware, software and biomedical applications.

J. Histochem. Cytochem., 27, 144-152

Brugal G. (1984) [87]

Image analysis of microscopic preparations.

In "Methods and achievements in experimental pathology" ; Karger, Basel, 11, 1-33

Brugal G. (1985) [87]

SAMBA 200 : système d'analyse microphotométrique à balayage automatique.

Technique et sciences informatiques, 4, 289-295

Buck C.A., Glick M.C. and Warren L. (1971) [82, 153]

Effect of growth on the glycoproteins from the surface of control and Rous Sarcoma Virus transformed Hamster cells.

Biochemistry, 10, 2176-2180

Burger M.M. and Goldberg A.R. (1967) [51]

Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 57, 359-366

C

Cacan R., Hoflack B. and Verbert A. (1980) [148]

Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes.

European Journal of Biochemistry, 106, 473-479

Campisi J., Morreo G. and Pardee A.B. (1984) [40]

Kinetics of G₁ transit following brief starvation for serum factors.

Experimental Cell Research, 152, 459-466

Capasso J.M., Abeljon C. and Hirschberg C.B. (1988) [50]

An intrinsic membrane glycoprotein of the golgi apparatus with O-linked N-acetylglucosamine facing the cytosol.

Journal of Biological Chemistry, 263, 19778-19782

Carbone M. and Levine A.S. (1990) [35]

Oncogenes, antioncogenes and the regulation of cell growth.

TEM, 248-253

Carraway K.L. and Hull S.R. (1989) [70]

O-glycosylation pathway for mucin-type glycoproteins.
BioEssays, 10, 117-122

Cavadore J.C., Le Bouffant F. et Labbé J.C. (1990) [32]

Les substrats de p34^{cdc2}, la kinase spécifique de la phase M du cycle cellulaire. La liste continue de s'allonger.
Médecine/Sciences, 6, 895-900

Ceccarini C. (1975) [71]

Appearance of smaller mannosylglycopeptides on the surface of a human cell transformed by Simian Virus 40.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 2687-2690

Chatterjee S., Sweeley C.C. and Velicer L.F. (1973) [79, 80]

Biosynthesis of proteins, nucleic acids and glycosphingolipids by synchronized KB cells.
Biochemical and Biophysical Research Communication, 54, 585-592

Chatterjee S., Velicer L.F. and Sweeley C.C. (1975) [79]

Glycosphingolipid glycosyl hydrolases and glycosidases of synchronized human KB cells.
The Journal of Biological Chemistry, 250, 4972-4979

Chigorno V., Sonnino S., Ghidoni R. and Tettamanti G. (1982) [54]

Densitometric quantification of brain gangliosides separated by two dimensional thin layer.
Neurochemistry International, 4, 531-539

Chiu R., Boyle W.J., Meek J., Smeal T., Hunter T. and Karin M. (1988) [35]

The C-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes.
Cell, 54, 541-552

Clarke J.T.R. (1975) [54]

Gangliosides of the bovine neurohypophysis
Journal of Neurochemistry, 24, 533-538

Collyn d'Hooghe M., Valleron A.J. and Malaise E.P. (1977) [14]

Time lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration
Experimental Cell Research, 106, 405-407

Collyn d'Hooghe M., Hemon D., Valleron A.J. and Malaise E.P. (1980a) [23]

Comparative effects of ionizing radiations on cycle time and mitotic duration. A time lapse cinematography study.
Radiation Research, 81, 384-392

Collyn d'Hooghe M., Hemon D., Gilet R., Curtis S., Valleron A.J. and Malaise E.P. (1980b) [23]

Comparative effects of ⁶⁰Co gamma rays hélium and neon ions on cycle duration and division probability of EMT6 cells. A time lapse cinematography study.
International Journal of Radiation Biology and related studies in Physical Chemistry Medicine, 39, 297-306

Conchie J. and Strachan I. (1978) [61]

The carbohydrate units of ovalbumin : complete structures of three glycopeptides.
Carbohydrate Research, 63, 193-213

Conradt P., Dittmar K.E.J., Schiephacke H. and Trowitzsch-Kienast W. (1989) [39]

Myxothiazol : a reversible blocker of the cell cycle.
The Journal of antibiotics, 42, 1158-1162

Conzelmann E. and Sandhoff K. (1987) [70]

Glycolipid and glycoprotein degradation.
Advances in enzymology, 60, 89-216

Costa M., Gerner E.W. and Russel D.H. (1976) [20]

G1 specific increases in cyclic AMP levels and protein kinase activity in chinese hamster ovary cells.
Biochimica et Biophysica Acta, 425, 246-255

Cross F., Roberts J. and Weintraub H. (1989) [16, 18]
Simple and complex cell cycles.
Annual Review of Cell Biology, 5, 341-395

D

Damsky C.H., Knudsen K.A. and Buck C.A. (1984) [74]
In "The Biology of Glycoproteins", 1-63
Ivatt R.J., ed. ; Plenum, New York

Dealtry G.B., Curry M.R. and Sellens M.H. (1987) [75]
Fucosylated glycoconjugates appear on mouse embryos during blastocyst formation.
The Journal of Experimental Zoology, 243, 163-169

Debray H. and Montreuil J. (1978) [64]
Isolation and characterization of surface glycopeptides from adult rat hepatocytes in an established line.
Biochimie, 60, 697-704

Debray H. (1979) [66]
Les glycoconjugués de la membrane de surface des cellules normales et cancéreuses.
Bulletin du Cancer, 66, 353-372

Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G. and Montreuil J. (1981) [113]
Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.
European Journal of Biochemistry, 117, 41-55

Debray H. and Montreuil J. (1983) [114, 116]
Structural basis for the affinity of four insolubilized lectins, with a specificity for α -D-mannose, towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides.
Journal of Biosciences, 5, 93-100

Debray H., Zhu Q., Delannoy P., Montreuil J., Dus D., Radzikowski C., Christensen B. and Kieler J. (1986) [71]

Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines.

International Journal of Cancer, 37, 607-611

Debray H. and Montreuil J. (1991) [109]

Lectin affinity chromatography of glycoconjugates.

In "Advances in Lectin Research" ; 51-96

Franz H. ed. ; Verlag Gesundheit GmbH Berlin.

Dennis J.W. and Kerbel R.S. (1981) [66]

Characterization of a deficiency in fucose metabolism in lectin-resistant variants of a murine tumor showing altered tumorigenic and metastatic capacities in vivo.

Cancer Research, 41, 98-104

Dennis J.W., Laferté S., Waghorne C., Breitman M.L. and Kerbel R.S. (1987) [71]

β 1,6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis.

Science, 236, 582-585

Djordjevic B. and Kin J.H. (1967) [39]

Lethal effect of phleomycin in different stages of the division cycle of HeLa cells.

Cancer Research, 27, 2255-2260

Doering T.L., Masterson W.J., Hart G.W. and Englund P.T. (1990) [57]

Biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors.

Journal of Biological Chemistry, 265, 611-614

Doolittle R.F. et al. (1983) [35]

Simian sarcoma virus oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor.

Science, 221, 275-277

Draetta G. and Beach D. (1988) [32]

Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells : cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement.

Cell, 54, 17-26

Draetta G., Luca F., Westendorf J., Brizuela L., Ruderman J. and Beach D. (1989) [29]

cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B : evidence for proteolytic inactivation of MPF.

Cell, 56, 829-838

Dunphy W.G., Brizuela L., Beach D. and Newport J. (1988) [31]

The xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis.

Cell, 54, 423-431

E

Edelman G.M. (1983) [74]

Cell adhesion molecules.

Science, 219, 450-457

El Rassi Z., Truei Y., Maa Y.F. and Horvath C. (1988) [112]

High-Performance Liquid Chromatography with Concanavalin A immobilized by metal interactions on the stationary phase.

Analytical Biochemistry, 169, 172-180

Emmelot P. (1973) [50]

Biochemical properties of normal and neoplastic cell surface : a review

European Journal of Cancer, 9, 319-333

Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D. and Hunt T. (1983) [28]

Cyclin : a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.

Cell, 33, 389-396

Everson L.K., Buell D.N. and Rogentine Jr G.N. (1973) [45]
 Separation of human lymphoid cells into G₁, S and G₂ cell cycle populations by use of a velocity sedimentation technique.
 Journal of Experimental Medicine, 137, 343-358

F

Fantes P.A. (1977) [16]
 Control of cell cycle size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*.
 Journal of Cell Sciences, 24, 51-67

Feizi T. (1981) [68, 69, 76]
 The blood group II system : a carbohydrate antigen system defined by naturally monoclonal or oligoclonal autoantibodies of man.
 Immunological Communications, 10, 127-156

Feizi T. (1985) [74]
 Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens.
 Nature, 314, 53-57

Ferguson M.A.J. and Williams A.F. (1988) [56]
 Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures.
 Annual Review of Biochemistry, 57, 285-320

Ferguson M.A.J., Homans S.W., Dwek R.A. and Rademacher I.W. (1988) [57]
 Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane.
 Science, 239, 753-759

Feulgen R. und Rossenbech H. (1924) [88]
 Mikroskopisch chemischer nachweis einer nucleinsäure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf hesuehnde elektive färbung von zellkernen in mikroskopischen präparaten.
 Zschr. Physiol. Chem., 135, 203-248

Finne J., Krusius T., Rauvala H. and Hemminki K. (1977) [63]

The disialyl group of glycoproteins.

European Journal of Biochemistry, 77, 319-323

Finne J. (1975) [63]

Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of rat brain glycoproteins.

Biochimica et Biophysica Acta, 412, 317-325

Finne J., Tao T.W. and Burger M.M. (1980) [50, 66]

Cancer Research, 40, 2580-2587

Finne J. and Makelä P.M. (1985) [63, 65]

Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase.

Journal of Biological Chemistry, 260, 1265-1270

Fox T.O. and Pardee A.B. (1970) [14]

Animal cells : non correlation of length of G1 phase with size after mitosis.

Science, 167, 80-82

Fox T.O., Sheppard J.R. and Burger M.M. (1971) [78]

Cyclic membrane changes in animal cells : transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 68, 244-247

François-Gérard C.H., Brocteur J., André A., Gerday C., Pierce-Creteil A., Montreuil J. and Spik G (1980) [63]

Demonstration of the existence of a specific blood-group P₁ antigenic determinant in turtle-dove ovomucoid.

In "Blood transfusion and immunohaematology", tome XXIII, n°5 ; 579-588

Frazier W.A. and Glaser L. (1979) [74]

Surface components and cell recognition.

Annual Review of Biochemistry, 48, 491-523

Freyer J.P., Wilder M.F. and Raju M.R. (1987) [46]

Rapid assay for cell age response to radiation by electronic volume flow cell sorting.

Int. J. Radiat. Biol., 52, 91-106

Fukuda M.N., Dell A., Oate J.E. and Fukwala M. (1985) [63, 72]

Embryonal lactosaminoglycan.

Journal of Biological Chemistry, 260, 6623-6631

Furthmayr H. (1977) [64]

Structural analysis of a membrane glycoprotein : glycophorin A.

J. Supramol. Struct., 7, 121-134

G

Gahmberg C.G. and Hakomori S.I. (1974) [80]

Organization of glycolipids and glycoproteins in surface membranes : dependency on cell cycle and on transformation.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 59, 283-291

Gautier J., Norbury C., Lohka M., Nurse P. and Maller J. (1988) [31]

Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*.

Cell, 54, 433-439

Gautier J., Matsukawa T., Nurse P. and Maller J. (1989) [32]

Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34^{cdc2} protein kinase during the cell cycle.

Nature, 339, 626-629

Geiger B. and Arnon R. (1976) [54]

Chemical characterization and subunit structure of human N-acetyl-hexosaminidases A and B.

Biochemistry, 15, 3484-3493

Geiger B., Arnon R. and Sandhoff K. (1977) [54]

Immunochemical and biochemical investigation of hexosaminidase S.

American Journal of Human Genetics, 29, 508-522

Gerner E.W., Glick M.C. and Warren L. (1970) [79]

Biosynthesis of the surface membrane during the cell cycle.
The Journal of Cellular Physiology, 75, 275-280

Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G., Bauman N., Reuter G. and Schauer R. (1980) [54]

Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid.
Journal of Biological Chemistry, 255, 6990-6995

Glick M.C., Gerner E.W. and Warren L. (1970) [79]

Changes in the carbohydrate content of the KB cell during the growth cycle.
The Journal of Cellular Physiology, 77, 1-6

Glick M.C. and Buck C.A. (1973) [10, 79, 83]

Glycoproteins from the surface of metaphase cells.
Biochemistry, 12, 85-90

Goldstein I.J. and Hayes C.E. (1978) [113]

The lectins : carbohydrate-binding proteins of plants and animals.
Advances in Carbohydr. Chem. Biochem., 35, 127-340

Gooi H.C., Feizi T., Kapadia A., Knowles B.B., Solter D. and Evans M.J. (1981) [76]

Stage-specific embryonic antigen involves α 1,3 fucosylated type 2 blood group chains.
Nature, 292, 156-158

Gorisse M.C., Carpentier Y. et Desoize B. (1990) [39]

Induction de quiescence par des agents différentiants.
Comptes Rendus de la Société de Biologie, 184, 363-369

Green E.D., Brodbeck R.M. and Baenziger J.U. (1987) [112, 126]

Lectin Affinity High-Performance Liquid Chromatography : interactions of N-glycanase-released oligosaccharides with Leukoagglutinating Phytohemagglutinin, Concanavalin A, Datura stramonium agglutinin and Vicia villosa agglutinin. Analytical Biochemistry, 167, 62-75

Greig R.G. and Jones M.N. (1977) [65]

Mechanisms of intracellular adhesion.

Biosystems, 9, 43-55

H

Hagan I., Hayles J. and Nurse P. (1988) [31]

Cloning and sequencing of the cyclin-related *cdc13* gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis.

Journal of Cell Biology, 91, 587-595

Hakomori S. and Murakami T. (1968) [70]

Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 59, 254-261

Hakomori et Jeanloz R. (1970) [72]

In "Blood and Tissue Antigens", 149

New York, Academic Press

Hakomori S.I. and Kobata A. (1974) [69]

In "The Antigens", 2, 79-140

Sela M. ed., Academic Press, New York

Hakomori S.I. (1975) [80]

Structures and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation.

Biochimica et Biophysica Acta, 417, 55-89

Hakomori S.I., Nudelman E., Lavery S., Solter D. and Knowles B.B. (1981) [50]

The hapten structure of a developmentally regulated glycolipid antigen (SSEA-1) isolated from human erythrocytes and adenocarcinoma : a preliminary note.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 100, 1578-1586

Hakomori S.I. (1984) [74]

Glycosphingolipids as differentiation-dependent, tumor-associated markers and as regulators of cell proliferation.

Trends in Biochemical Sciences, 453458

Hakomori S.I. (1989) [72]

Aberrant glycosylation in tumors and Tumor-Associated carbohydrate Antigens.

Advances in Cancer Research, 52, 257-331

Hamlin J.L. and Pardee A.B. (1976) [41]

S-phase synchrony in monolayer CHO cuclture.

Experimental Cell Research, 100, 265-273

Hatakeyama M. and Taniguchi T. (1988) [37]

Dysregulation of growth factor-receptor system in cellular transformation.

Japanese Journal of Cancer Research, 79, 885-901

Hatakeyama S. and Suzuki A. (1990) [39]

S-phase accumulation of human salivary adenocarcinoma cells by cycloheximide.

Cell Biology International Reports, 14, 1133-1141

Higashi H., Fukui Y., Ueda S., Kato S., Hirabayashi Y., Matsumoto M. and Naiki M. (1984) [53]

Sensitive enzyme-immunostaining and densitometric determination on thin-layer chromatography of N-glycolylneuraminic acid-containing glycosphingolipids, Hanganutziu-Deicher Antigen.

Journal of Biochemistry, 95, 1517-1520

Hindley J. and Phear G.A. (1984) [31]

Sequence of the cell division gene cdc2 from Schizosaccharomyces pombe ; patterns of splicing and homology to protein kinases.

Gene, 31, 129-134

Hoflack B. and Kornfeld S. (1985a) [64]

Lysosomal enzyme binding to mouse P388D₁ macrophage membranes lacking the 215kDa mannose 6-phosphate receptor : evidence for the existence of mannose 6-phosphate receptor.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 82, 4428-4432

Hoflack B. and Kornfeld S. (1985b) [64]

Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D₁ macrophages and bovine liver.

Journal of Biological Chemistry, 260, 12008-12014

Hon Chui S., Wai Kei Lam C., Lewis W.H.P. and Neng Lai K. (1990) [112]

High-Performance Liquid Chromatography for the purification of immunoglobulin A from human serum using jacalin.

Journal of Chromatography, 514, 219-225

Honda S., Suzuki K., Suzuki S. and Kakehi K. (1988) [112]

High-Performance Affinity Chromatography of carbohydrate-binding proteins by two-stage separation on a resin carrying a number of oligosaccharides.

Analytical Biochemistry, 169, 239-245

Horowitz M.I. (ed.) (1982) [57]

In "The Glycoconjugates", 3, part A and 4, part B
Academy Press, New York

Howard A. and Pelc S.R. (1951) [13]

Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiography.

Experimental Cell Research, 2, 178-187

Huberman J.A. (1981) [39]

New views of the biochemistry of eukaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an usual inhibitor of DNA polymerase.

Cell, 23, 647-648

Hughes R.L. (1975) [50]

The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles.

In "Essays Biochem.", 11, 1-36

Campbell P.N. and Aldrig W.N. (eds.), Academic Press, London

Hughes R.C. (1976) [50]

In "Membrane Glycoproteins. A review of structure and function." ;
Hughes R.C. ed., Butterworth, London

I

Ikegami S., Taguchi T., Ohashi K., Oguro K., Nagano H. and Nano Y. (1978) [39]

Aphidicolin prevent mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α .

Nature, 275, 458-460

Inbar M. and Sachs L. (1969) [51]

Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells.

Nature, 223, 710-712

Ishii S. and Volpe J.J. (1987) [81]

Dolichol-linked glycoprotein synthesis in G₁ is necessary for DNA synthesis in synchronized primary cultures of cerebral glia.

Journal of Neurochemistry, 49, 1606-1612

Ishii S. and Volpe J.J. (1990) [82]

N-linked glycoprotein synthesis and transport during G₁ are necessary for astrocytic proliferation.

Journal of Neuroscience Research, 26, 419-427

Ito S., Yamashita K., Spiro R.G. and Kobata A. (1977) [61]

Structure of a carbohydrate moiety of a unit A glycopeptide of calf thyroglobulin.

The Journal of Biochemistry (Tokyo), 81, 1621-1631

Ivatt R.J. (1984) [74]

In "The Biology of Glycoproteins", 95-181

Ivatt R.J., ed. ; Plenum, New York.

J-K

Jacobs S., Shechter Y., Bissel K. and Cuatrecasas P. (1977) [64]

Purification and properties of insulin receptors from rat liver membranes.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 77, 981-988

Kakehi K., Kojima Y., Suzuki S. and Honda S. (1990) [112]

Effect of chain length of oligosaccharide in high-performance affinity chromatography of a lectin on oligosaccharide-immobilized columns.

Journal of Chromatography, 502, 297-304

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G. and Clamp J.R. (1975) [120]

Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides.

Biochemical Journal, 151, 491-495

Kannagi R., Levery S.B., Ishigami F., Hakomori S.I., Shevinsky L.H., Knowles B.B. and Solter D. (1983) [54, 72]

New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3.

Journal of Biological Chemistry, 258, 8934-8942

Kauffman M.G., Noga S.J., Kelly T.J. and Donnenberg A.D. (1990) [46]

Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation

Analytical Biochemistry, 191, 41-46

Keyomarsi K., Sandoval L., Band V. and Pardee A.B. (1991) [39]
Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovablastin.

Cancer Research, 51, 3602-3609

Koide N. and Muramatsu T. (1974) [123]

Endo- β -N-acetylglucosaminidase acting on carbohydrate moieties of glycoproteins. Purification and properties of the enzyme from *Diplococcus pneumoniae*.

Journal of Biological Chemistry, 249, 4897-4904

Kornfeld K., Reitman M.L. and Kornfeld R. (1981) [113]

The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant.

Journal of Biological Chemistry, 256, 6633-6640

Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985) [70]

Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.

Annual Review of Biochemistry, 54, 631-664

Koscielak J., Piasek A., Gorniak H., Gardas A. and Gregor A. (1973) [68]

Structures of fucose-containing glycolipids with H and B blood-group activity and of sialic acid and glucosamine containing glycolipid of human erythrocyte membrane.

European Journal of Biochemistry, 37, 214-225

Koscielak J., Miller-Podraza H., Krauze R. and Piasek A. (1976) [63]

Isolation and characterization of poly(glycosyl)ceramides (megaloglycolipids) with A, H and I blood-group activities.

European Journal of Biochemistry, 71, 9-18

Koscielak J. (1986) [50]

A hypothesis on the biological role of ABH, Lewis and P blood group determinant structures in glycosphingolipids and glycoproteins.

Glycoconjugate Journal, 3, 95-108

Kraemer P.M. (1967) [77]

Configuration change of surface sialic acid during mitosis.

Journal of Cell Biology, 33, 197-200

Kundu S.K., Samuelson B.E., Pasher I. and Marcus D.M. (1983) [54]

New gangliosides from human erythrocytes.

Journal of Biological Chemistry, 258, 13857-13866

L

Labbe J.C., Lee M.G., Nurse P., Picard A. and Doree M. (1988) [28, 31]

Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2*.

Nature, 335, 251-254

Labbé J.C., Picard A., Peaucellier G., Cavadore J.C., Nurse P. and Dorée M. (1989a) [32]

Purification of MPF from starfish : identification as the H1 histone kinase $p34^{cdc2}$ and a possible mechanism for its periodic activation.

Cell, 57, 253-263

Labbé J.C., Capony J.P., Caput D., Cavadore J.C., Derancourt J., Kaghad M., Lelias J.M., Picard A. and Dorée M. (1989b) [32]

MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is an heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B.

EMBO Journal, 8, 3053-3058

Laemmli U.K. (1970) [119]

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-685

LaMont J.T., Gammon M.T. and Isselbacher K.J. (1977) [79]

Cell-surface glycosyltransferases in cultured fibroblasts : increased activity and release during serum stimulation of growth.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74, 1086-1090

Larsson O. (1985) [81]

Commitment events in early G1. Requirement for the synthesis of dolichol dependent glycoproteins.

Cell Biology International Reports, 9, 627-636

Larsson O. (1988) [40, 81]

The role of HMG CoA reductase and dolichol synthesis in the control of 3T6 cell proliferation : effects of cell crowding, serum depletion and addition of epidermal growth factor.

Journal of Cell Science, 90, 613-620

Laskey R.A., Fairman M.P. and Blow J.J. (1989) [16]

S phase of the cell cycle.

Science, 246, 609-614

Lennarz W.J. (1983) [74]

Glycoprotein synthesis and embryonic development.

CRC Critical Reviews in Biochemistry, 14, 257-272

Ley K.D. and Tobey R.A. (1970) [40]

Regulation of initiation of DNA synthesis in chinese hamster cells.

Journal of Cell Biology, 47, 453-459

Lindahl P.E. (1948) [45]

Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes.

Nature, 161, 648-649

Liotta L.A. (1986) [35]

Tumor invasion and metastases. Role of the extracellular matrix.

Cancer Research, 46, 1-7

Lis H. and Sharon N. (1973) [113]

The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins).

Annual Review of Biochemistry, 42, 541-574

Lis H. and Sharon N. (1977) [113]

Lectins : their chemistry and application to immunology.

In "The Antigens", 4, 429-529

Sela M., ed. ; Academic Press, New York

Lis H. and Sharon N. (1981) [109]

Affinity chromatography for the purification of lectins.

Journal of Chromatography, 215, 361-372

**Liu Y.C., Marracino R.L., Keng P.C.K., Bambara R.A., Lord E.M.,
Chou W.G. and Zain S.B. (1989) [22]**

Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the chine hamster ovary cell cycle.

Biochemistry, 28, 2967-2974

Lloyd C.W. (1975) [51]

Sialic acid and the social behaviour of cells

Biol. Rev., 50, 325-350

Lohka M.J., Hayes M.K. and Maller J.L. (1988) [28]

Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85, 3009-3013

**Loomes L.M., Vemura K., Childs R.A., Paulson J.C., Rogers G.N.,
Scudder P.R., Michalski J.C., Hounsell E.F., Taylor-Rolinon D. and
Feizi T. (1984) [50]**

Erythrocyte receptors of Mycoplasma pneumoniae are sialylated oligosaccharides of Ii antigen type

Nature, 307, 560-563

Lyer R.N. and Carlson D.M. (1971) [124]

Alkaline borohydride degradation of blood group H substance.

Archives in Biochemistry and Biophysics, 142, 101-105

M

Macara I.G., Marinetti G.V. and Balduzzi P.C. (1984) [19]

Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity : possible role in tumorigenesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 81, 2728-2732

Mc Clain P., D'Eustachio P. and Edelman G.M. (1977) [78]

Role of surface modulating assemblies in growth control of normal and transformed fibroblasts.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74, 666-670

Mc Coy R.D., Vimr E.R. and Troy F.A. (1985) [63]

CMP-NeuAc : poly- α 2,8-sialosyl sialyltransférase and the biosynthesis of polyalosyl units in neural cell adhesion molecules.

Journal of Biological Chemistry, 260, 12695-12699

Mc Donald H.R. and Miller G. (1970) [45]

Synchronization of mouse L-cells by a velocity sedimentation technique.

Biophysical Journal, 10, 834-842

Mc Intosh and Koonce M.P. (1989) [16]

Mitosis

Science, 246, 622-628

Mc Keehnan W. and Hardesty B. (1969) [39]

The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 36, 625-630

Macpherson I. and Stoker M. (1962) [85]

Polyoma transformation of hamster cell clones. an investigation of genetic factors affecting cell competence.

Virology, 16, 147-151

Madoc-Jones H. and Mauro F. (1968) [39]

Interphase action of vinblastine and vincristine : differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells.

Journal of Cellular Physiology, 72, 185-196

Magnuson T. and Stackpole C.W. (1978) [75]

Lectin-mediated agglutination of preimplantation mouse embryos.

Experimental Cell Research, 116, 467-469

Makita A. and Taniguchi N. (1985) [52, 70]

Glycosphingolipids.

In "Glycolipids", 1-100

Wiegandt (ed.), Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

Martinez-Palomo A. (1970) [74]

Surface coats of animal cell.

International Review of Cytology, 29, 29-75

Masui Y. and Markert C.L. (1971) [27]

Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes.

Journal of Experimental Zoology, 177, 129-145

Matherly L.H., Schuetz J.D., Westin E. and Goldman I.D. (1989) [39, 95]

A method for the synchronization of cultured cells with aphidicolin : application to the large-scale synchronization of L1210 cells and the study of cell cycle regulation of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase.

Analytical Biochemistry, 182, 338-345

Mayhew E. (1966) [77]

Cellular electrophoretic mobility and the mitotic cycle.

The Journal of General Physiology, 49, 717-725

- Meezan E., Wu H.C., Black P.H. and Robbins P.W. (1969) [71]**
Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse.
Biochemistry, 8, 2518-2524
- Meijer L., Arion D., Golsteyn R., Pines J., Brizuela L., Hunt T. and Beach D. (1989) [32]**
Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase.
EMBO Journal, 8, 2275-2282
- Meistrich M.L., Meyn R.E. and Barlogie B. (1977) [45]**
Synchronization of mouse L-P59 cells by centrifugal elutriation separation.
Experimental Cell Research, 105, 169-177
- Melamed M.R., Mullaney P.F. and Mendelsohn M. (1979) [89]**
Flow cytometry and sorting.
John Wiley and Sons., New York
- Merkle R.K. and Cummings R.D. (1987) [109]**
Lectin affinity chromatography of glycopeptides.
In "Methods in Enzymology, 138, 232-259
Academic Press
- Miake-Lye R., Newport J. and Kirschner M. (1983) [27]**
Maturation-promoting factor induces nuclear envelope breakdown in cycloheximide-arrested embryos of *Xenopus laevis*.
Journal of Cell Biology, 97, 81-91
- Minshull J., Blow J. and Hunt T. (1989) [29]**
Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis.
Cell, 56, 947-956

Mitchell B.F. and Tupper J.T. (1977) [45]

Synchronization of mouse 3T3 and SV40 3T3 cells by way of centrifugal elutriation.

Experimental Cell Research, 106, 351-355

Mitchison J.M. and Vincent W.S. (1965) [45]

Preparation of synchronous cell cultures by sedimentation.

Nature, 205, 987-989

Monsigny M., Kieda C. and Roche A.C. (1979) [65]

Membrane lectins.

Biol. Cellulaire, 36, 289-300

Montreuil J., Debray H., Debeire P. and Delannoy P. (1983) [116]

Lectins as oligosaccharide receptors.

In "Structural carbohydrates in the liver", 239-258

Popper H., Reutter W., Köttgen E. and Gudat F., eds.

MTP Press Limited, Boston, the Hague, Dordrecht, Lancaster.

Proceedings of the 34th Falk Symposium held during Basel Liver Week, Basel, October 12-18 1982

Montreuil J. (1984a) [57, 60]

Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function, survey of a decade of research.

Pure and Applied Chemistry and Biochemistry, 56, 859-877

Montreuil J. (1984b) [57, 60, 69]

Spatial conformation of glycans and glycopeptides.

Bio. Cell, 51, 115-132

Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G. and Strecker G. (1986) [120]

Glycoproteins.

In "Carbohydrate analysis, a practical approach", 143-204

Chaplin M.F. and Kennedy J.F., eds. ; IRL Press, Oxford, Washington D.C.

Morell A.G., Irvine R.A., Sternlieb I.H., Scheinberg I.H. and Ashwell G. (1968) [64]

Physical and chemical studies on ceruloplasmin.
Journal of Biological Chemistry, 243, 155-159

Morris N.R. and Fisher G.A. (1963) [41]

Studies concerning the inhibition of cellular reproduction by deoxyribonucleosides. I. Inhibition of the synthesis of deoxycytidine by a phosphorylated derivative of thymidine.
Biochimica et Biophysica Acta, 68, 84-92

Morris N.R., Reichard P. and Fisher G.A. (1963) [41]

Studies concerning the inhibition of cellular reproduction by deoxyribonucleosides. II. Inhibition of the synthesis of deoxycytidine by thymidine, deoxyadenosine and deoxyguanosine.
Biochimica et Biophysica Acta, 68, 93-99

Morris G.F. and Mathews M.B. (1989) [22]

Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle.
Journal of Biological Chemistry, 264, 13856-13864

Moustafa Y. and Brugal G. (1984) [87]

Image analysis of cell proliferation and differentiation in the thymus of the newt *Pleurodeles Walthii* Michah by SAMBA 200 cell image processing.
Roux's Arch. Dev. Biol., 193, 139-148

Muramatsu T., Atkinson P.H. and Nathenson S.G. (1973) [82, 120, 153]

Cell-surface glycopeptides : growth-dependent changes in the carbohydrate-peptide linkage region.
Journal of Molecular Biology, 80, 781-799

Muramatsu T., Gachelin G., Nicolas J.F., Condamine H., Jakob H. and Jacob F. (1978) [76]

Carbohydrate structure and cell differentiation : unique properties of fucosyl-glycopeptides isolated from embryonal carcinoma cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75, 2315-2319

Muramatsu T., Gachelin G. and Jacob F. (1979a) [76]

Characterization of glycopeptides isolated from membranes of F9 embryonal carcinoma cells.

Biochimica et Biophysica Acta, 587, 392-406

Muramatsu T., Gachelin G., Damonville M., Delarbre C. and Jacob F. (1979b) [76]

Cell surface carbohydrates of embryonal cells : polysaccharidic side chains of F9 antigens and of receptors to two lectins, FBP and PNA.

Cell, 18, 183-191

Muramatsu T., Condamine H., Gachelin G. and Jacob F. (1980) [76]

Changes in fucosyl-glycopeptides during early post-implantation embryogenesis in the mouse.

J. Embryol. Exp. Morphol., 57, 25-36

Muramatsu H., Ishihara H., Miyauchi T., Gachelin G., Fujisaki T., Tejima S. and Muramatsu T. (1983) [76]

Glycoprotein-bound large carbohydrates of early embryonic cells : structural characteristic of the glycan isolated from F9 embryonal carcinoma cells.

Journal of Biochemistry (Tokyo), 94, 799-810

Murray A.W. (1987) [28]

Cyclins in meiosis and mitosis.

Nature, 326, 542-543

Murray A.W. and Kirschner M.W. (1989) [29, 30, 32]

Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle.

Nature, 339, 275-280

Murray A.W., Solomon M.J. and Kirschner M.W. (1989) [32]

The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity.

Nature, 339, 280-286

N

Naiki M., Ikuta K., Fujii Y. and Kato S. (1981) [53]

In "Glycoconjugates", Proc VI. Int. Symp., 185-186

Yamakawa T., Osawa T. and Handa S. eds. ; Jpn. Sci. Soc. Press

Neant I., Charbonneau M. and Guerrier P. (1989) [32]

A requirement for protein phosphorylation in regulating the meiotic and mitotic cell cycles in echinoderms.

Developmental Biology, 132, 304-314

Neckers L.M. (1991) [16]

Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth.

Pathobiology, 59, 11-18

Nelkin B., Nichols C. and Vogelstein B. (1980) [27]

Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes.

FEBS Letters, 109, 233-238

Nias A.H.W. and Fox M. (1971) [45]

Synchronization of mammalian cells with respect to the mitotic cycle.

Cell Tissue Kinet., 4, 375-398

Nicolson G.L. (1974) [75, 113]

The interaction of lectins with animal cell surfaces.

International Review of Cytology, 39, 89-190

Nicolson G.L. and Yanagimachi R. (1974) [76]

Mobility and the restriction of mobility of plasma membrane lectin-binding components.

Science, 184, 1294-1296

Niemann H., Watanabe K., Hakomori S.I., Childs R.A. and Feizi T. (1978) [76]

Blood group i and I activities of "lacto-N-norhexaosylceramide" and its analogues : the structural requirements for i specificities.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 81, 1286-1293

Nilsson K. and Mosbach K. (1981) [110]

Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 102, 449-457

Nishikawa Y. (1991) [82]

An FM3A mutant, G258, with a mutation that affects both cell growth and oligosaccharide-lipid synthesis.

Biochimica et Biophysica Acta, 1091, 135-140

Nishizuka Y. (1984) [18]

Turnover of inositol phospholipids and signal transduction.

Science, 25, 1365-1370

Noonan K.D. and Burger M.M. (1971) [72]

Proceedings of the first conference and workshops on embryonic and fetal antigens in cancer.

Oak Ridge, Tennessee, Oak Ridge Nat. Lab., 59-69

Nowakowski M., Atkinson P.H. and Summers D.F. (1972) [79]

Incorporation of fucose into HeLa cell plasma membranes during the cell cycle.

Biochimica et Biophysica Acta, 266, 154-160

Nurse P., Thuriaux P. and Nasmyth K. (1976) [31]

Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Molecular and General Genetics, 146, 167-178

Nurse P. and Thuriaux P. (1980) [31]

Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Genetics, 96, 627-637

Nurse P. and Bissett Y. (1981) [31]

Gene required in G_1 for commitment to cell cycle and in G_2 for control of mitosis in fission yeast.

Nature, 292, 558-560

0

Ogata S.I., Muramatsu J. and Kobata A. (1976) [71]

New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells.

Nature, 259, 580-582

Ohlson S., Hansson L., Larsson P.O. and Mosbach K. (1978) [110]

High Performance Liquid Affinity Chromatography (HPLAC) and its application to the separation of enzymes and antigens.

FEBS Letters, 93, 5-9

Olden K., Pratt R.M., Jaworski C. and Yamada K.M. (1979) [69]

Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport : specific inhibition by tunicamycin.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 791-795

Oliver G.J.A. and Hemming F.W. (1975) [148, 149]

The transfer of mannose to dolichol diphosphate oligosaccharides in pig liver endoplasmic reticulum.

Biochemical Journal, 152, 191-199

Oppenheimer S.B. (1977) [75]

Interactions of lectins with embryonic cell surfaces.

Current Topics in Developmental Biology, 11, 1-16

Osley M.A. (1991) [22]

The regulation of histone synthesis in the cell cycle.

Annual Review of Biochemistry, 60, 827-861

P

Pardee A.B. (1974) [16]

A restriction point for control of normal animal cell proliferation.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 71, 1286-1290

Pardee A.B. (1975) [70]

The cell surface and fibroblast proliferation. Some current research trends.

Biochimica et Biophysica Acta, 417, 153-171

Pardee A.B. (1987) [18]

Molecules involved in proliferation of normal and cancer cells : presidential address.

Cancer Research, 47, 1488-1491

Pardee A.B. (1989) [16]

G₁ events and regulation of cell proliferation.

Science, 246, 603-608

Passaniti A. and Hart G.W. (1988) [66]

Cell surface sialylation and tumor metastasis.

Journal of Biological Chemistry, 263, 7591-7603

Pastan I.H., Johnson G.S. and Anderson W.B. (1975) [20]

Role of cyclic nucleotides in growth control.

Annual Review of Biochemistry, 44, 491-522

Pasternak C.A., Sumner M.C.B. and Collin R.C.L.S. (1974) [78]

In "Cell cycle controls", 117

Padilla G.M., Cameron J.L. and Zimmerman A.M., eds. ; Academic Press, New York.

Pasternak C.A. (1976) [26]

Surface membrane during the cell cycle.

Trends in Biochemical Science, 148-151

Pazur J.H. (1981) [109]

In "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry", 39, 405-447

Tipson R.S., Horton D., eds. ; Academic Press, New York

Pedemonte C.H., Sachs G. and Kaplan J.H. (1990) [50]

An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented N-linked sugars.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87, 9789-9793

Pienkowski M. (1974) [75]

Study of the growth regulation of preimplantation mouse embryos using concanavalin A.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 145, 464-469

Pierce M. and Arango J. (1986) [71]

Rous sarcoma virus transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing / GlcNAc(β 1,6)Man(α 1,6)Man / and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells.

Journal of Biological Chemistry, 261, 10772-10777

Pines J. and Hunt T. (1987) [29]

Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs.

EMBO Journal, 6, 2987-2995

Piras R. and Piras M.M. (1975) [24, 39]

Changes in microtubule phosphorylation during the cell cycle of HeLa cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 1161-1165

Prujansky-Jacobovits A., Gachelin G., Muramatsu T., Sharon N. and Jacob F. (1979) [74, 76]

Surface galactosyl glycopeptides of embryonal carcinoma cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 89, 448-455

R

Rajalakshmi S., Liand H., Sarma S.R., Kisilevsky R. and Farber E. (1971) [39]

Cycloheximide, an inhibitor of peptide chain termination of release in liver in vivo and in vitro.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 42, 259-265

Ravdin J.I., Stanley P., Murphy C.F. and Petri Jr W.A. (1989) [64]

Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin.

Infection and Immunity, 57, 2179-2186

Rayter S.I., Iwata K.K., Michitsch R.W., Sorvillo J.M., Valenzuela D.M. and Foulkes J.G. (1989) [21, 36]

Biochemical functions of oncogenes.

In "Oncogenes", 113-189

Glover D.M. and Hames B.D., eds. ; IRL Press at Oxford University Press.

Reid B.J. and Hartwell L.H. (1977) [31]

Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Cell Biology, 75, 355-365

Reisner Y., Gachelin G., Dubois P., Nicolas J.F., Sharon N. and Jacob F. (1977) [75]

Interaction of peanut agglutinin, a lectin specific for nonreducing terminal D-galactosyl residues, with embryonal carcinoma cells.

Developmental Biology, 61, 20-27

Renauer D., Oesch F., Kinkel J., Unger K.K. and Wieser R.J. (1985) [112]

Fractionation of membrane proteins on immobilized lectins by High-Performance Liquid Affinity Chromatography.

Analytical Biochemistry, 151, 424-427

Rice G.C., Dean P.N., Gray J.W. and Dewey W.C. (1984) [47]

An ultra-pure in vitro phase synchrony method employing centrifugal elutriation and viable flow cytometric cell sorting.

Cytometry, 5, 289-298

Robbins E., Marcus P.J. (1964) [106]

Mitotically synchronized mammalian cells : a simple method for obtaining large populations.

Science, 144, 1152-1153

Robbins E., Jentzsch G. and Micali A. (1968) [14]

The centriole cycle in synchronized HeLa cells.

The Journal of Cell Biology, 36, 329-339

Robbins J.C. and Nicolson G.L. (1975) [74]

Surfaces of normal and transformed cells.

In "Biology of tumours : surfaces, immunology and comparative pathology", 4, 3-54 Plenum Publishing Corporation, New York

Roseman S. (1974) [74]

In "Cell surface in Development", 255-271

Moscona A.A., ed. ; Wiley, New York.

Rosow P.W., Riddle V.G.H. and Pardee A.B. (1979) [16, 17]

Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 4446-4450

Rowinsky J., Solter D. and Koprowski H. (1976) [75]

Change of concanavalin A induced agglutinability during preimplantation mouse development.

Experimental Cell Research, 100, 404-408

Roy L.M., Swenson K.I., Walker D.H., Gabrielli B.G., Li R.S., Piwnica-Worms H. and Maller J.L. (1991) [31]

Activation of p34^{cdc2} kinase by cyclin A.

The Journal of Cell Biology, 113, 507-514

Rueckert R.R. and Mueller G.C. (1960) [41]

Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequences of thymidine deficiency.

Cancer Research, 20, 1584-1591

S

Sahagian G.G., Distler J. and Jourdian G.W. (1981) [64]

Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular β -galactosidase.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 78, 4289-4293

Sasak W., Herscovics A. and Quaroni A. (1982) [83]

Cell-density-dependent changes in cell surface glycopeptides and in adhesion of cultured intestinal epithelial cells.

Biochemical Journal, 201, 359-366

Sasak W., Quaroni A. and Hercovics A. (1983) [83]

Changes in cell surface fucose containing glycopeptides and adhesion of cultured intestinal epithelial cells as a function of cell density.

Biochemical Journal, 211, 75-80

Schachter H. and Brockhausen I. (1989) [70]

The biosynthesis of branched O-glycans.

in "Mucus and related topics" ; 1-26

Symposia of the society for experimental biology.

Edited by E. Chantler and N.A. Ratcliffe.

Sharon N. and Lis N. (1982) [57]

In "The Proteins", 3rd edn., 5, 1-144

Neurath H. and Hill R.L. eds., Academic Press, New York

Sharon N. (1983) [75]

Lectin receptors as lymphocyte surface markers.

Advances in Immunology, 34, 213-298

Shibuya N., Goldstein I.J., Broeckaert W.F., Nsimba-Lubaki M., Peeters B. and Peumans W.J. (1987) [114, 116]

The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence.

The Journal of Biological Chemistry, 262, 1596-1601

Simanis V. and Nurse P. (1986) [32]

The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation.

Cell, 45, 261-268

Singer S.J. and Nicholson G.L. (1972) [48]

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Science, 175, 720-731

Sluder G. (1989) [24]

Centrosomes and the cell cycle.

Journal of Cell Science Suppl., 12, 253-275

Sobel J.S. and Nebel L. (1976) [75]

Concanavalin A agglutinability of developing mouse trophoblast.

Journal of Reproduction and Fertility, 47, 399-402

Solomon M., Booher R., Kirschner M. and Beach D. (1988) [31]

Cyclin in fission yeast.

Cell, 54, 738-739

Springer G.F., Desai P.R., Banatwala I. (1974) [72]

Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues.

Naturwissenschaften, 61, 457-458

Stambrook P.J. and Velez C. (1976) [39]

Reversible arrest of chinese hamster V79 cells in G₂ by dibutyryl AMP.

Experimental Cell Research, 99, 57-62

Stéhelin D. (1988) [35]

Dissection moléculaire des cancers.

Bulletin de l'Institut Pasteur, 86, 225-242

**Strominger J.L., Cresswell P., Grey H., Humphreys R.E., Mann D.,
Mc Cune J., Parham P., Robb R., Sanderson A.R., Springer T.A.,
Terhorst C. and Turner M.J. (1974) [69]**

The immunoglobulin-like structure of human histocompatibility antigens.

Transplantation Reviews, 21, 126-143

Stubblefield E. and Klevecz R. (1965) [39]

Synchronization of Chinese Hamster cells by reversal of colcemid inhibition.

Experimental Cell Research, 40, 660-664

Studzinski G.P. and Lambert W.C. (1969) [44, 94]

Thymidine as a synchronizing agent. I. Nucleic acid and protein formation in synchronous HeLa cultures treated with excess thymidine.

Journal of Cellular Physiology, 73, 109-117

Studzinski G.P. (1989) [35]

Oncogenes, growth, and the cell cycle : an overview.

Cell Tissue Kinetics, 22, 405-424

Sugimoto Y., Whitman M., Cantley L.C. and Erikson R.L. (1984) [19]

Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 81, 2117-2121

Sunkara P.S., Wright D.A. and Rao P.N. (1979) [27]

Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 2799-2802

Suzuki Y., Nagao Y., Kato H., Matsumoto M., Nerome K., Nakajima K. and Nobusawa E. (1986) [50]

Human Influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligo-saccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection.

Journal of Biological Chemistry, 261, 17057-17061

Svennerholm L. (1963) [54, 55]

Chromatographic separation of human brain gangliosides.

Journal of Neurochemistry, 10, 613-623

Swenson K.I., Farrell K.M. and Ruderman J.V. (1986) [28]

The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes.

Cell, 47, 861-870

T

Tachibana K., Yanagishima N. and Kishimoto T. (1987) [27]

Preliminary characterization of maturation-promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Cell Science, 88, 273-281

Takasaki S., Yamashita K. and Kobata A. (1978) [69]

The sugar chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocytes membrane.

Journal of Biological Chemistry, 253, 6086-6091

Terasima T. and Tolmach L.J. (1962) [45, 100]

Synchronously dividing populations of HeLa cells.

Experimental Cell Research, 30, 344-362

Terasima T. and Tolmach L.J. (1963) [45]

Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells.

Experimental Cell Research, 30, 344-362

Tettamanti G., Bertona L., Berra B. and Zambotti V. (1965) [53]

Glycolyl-neuraminic acid in Ox brain gangliosides.

Nature, 206, 192

Till J.E., Whitmore G.F. and Gulyas S. (1963) [41]

Deoxyribonucleic acid synthesis in individual L-strain mouse cells. II. Effects of thymidine starvation.

Biochimica et Biophysica Acta, 72, 277-

Tobey R.A. (1973) [40]

Production and characterization of mammalian cells reversibly arrested in G1 by growth in isoleucine-deficient medium.

Meth. Cell Biol., 6, 67-112

Tobey R.A., Oishi N. and Crissman H.A. (1990) [39, 44, 100]

Cell cycle synchronization : reversible induction of G2 synchrony in cultured rodent and human diploid fibroblasts.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87, 5104-5108

Toyoshima S., Osawa T. and Tonomura A. (1970) [119]

Some properties of purified phytohemagglutinin from Lens culinaris seeds.

Biochimica et Biophysica Acta, 221, 514-521

Turner R.S. and Burger M.M. (1974) [78]

A cell surface change in mitotic fibroblasts monitored with lectins.

Annals New York Academy of Sciences, 234, 332-347

V-W

Von Figura K. and Hasilik A. (1986) [64]

Lysosomal enzymes and their receptors.

Annual Review of Biochemistry, 55, 167-193

Walters R.R. (1982) [110]

High-Performance Affinity Chromatography : pore-size effects.

Journal of Chromatography, 249, 19-28

Warren L., Fuhrer J.P. and Buck C.A. (1972) [71, 82]

Surface glycoproteins of normal and transformed cells : a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyltransferase.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 69, 1838-1842

Warren L., Buck C.A. and Tuszynski G.P. (1978) [71]

Glycopeptide changes and malignant transformation, a possible role for carbohydrates in malignant behavior.

Biochimica et Biophysica Acta, 516, 97-127

Wasserman W.J. and Masui Y. (1975) [27]

Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes.

Experimental Cell Research, 91, 381-388

Wasserman W.J. and Smith L.D. (1978) [27]

The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown.

Journal of Cell Biology, 78, R15-22

Watanabe K., Hakomori S., Childs R.A. and Feizi T. (1979) [76]

Characterization of a blood group I active ganglioside.

Journal of Biological Chemistry, 254, 3221-3228

Watkins W.M. (1979) [50]

Biochemistry of blood cell membrane antigens.

Rev. Franç. Transfus. Immunohematol., 22, 35-57

Watson P.A., Hanauske-Abel H.H., Flint A. and Lalande M. (1991) [39]

Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border.

Cytometry, 12, 242-246

Weintraub H., Buscaglia M., Ferrez M., Weiller S., Boulet A., Fabre F. and Baulieu E.E. (1982) [27]

Mise en évidence d'une activité "MPF" chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 295, 787-790

Weinstein I.B. (1987) [37]

Growth factors, oncogenes and multistage carcinogenesis.
Journal of Cell Biochemistry, 33, 213-224

Wharton W., Van Wyk J.J. and Pledger W.J. (1981) [40]

Inhibition of BALB/c-3T3 cells in late G₁ : commitment to DNA synthesis controlled by somatomedin C.
The Journal of Cellular Physiology, 107, 31-39

Whitaker M. and Patel R. (1990) [32]

Calcium and cell cycle control.
Development, 108, 525-542

Whitfield W.G.F., Gonzalez C., Maldonado-Codina G. and Glover D.M. (1990) [29]

The A- and B-type cyclins of Drosophila are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G₂-M transition.
The EMBO Journal, 9, 2563-2572

Wiegandt H. (1985) [53, 54, 70]

Gangliosides.

In "Glycolipids", 199-260

Wiegandt (ed.), Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

Wieser R.J. and Oesch F. (1992) [66]

Contact-inhibition of growth by complex carbohydrates.
Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 4, 160-167

Wilchek M., Miron T. and Kohn J. (1984) [109]

Affinity Chromatography.

Methods in Enzymology, 104, 3-55

Winzler R.J. (1970) [64]

In "Blood in tissue antigens", 117-126

Aminoff D. ed., Academic Press, New York, London

Wolf B.A. and Robbins P.W. (1974) [80]

Cell mitotic cycle synthesis of NIL hamster glycolipids including the Forssman antigen.

The Journal of Cell Biology, 61, 676-687

X-Y

Xeros N. (1962) [41]

Deoxyriboside control and synchronization of mitosis.

Nature, 194, 682-683

Yamamoto K., Tsuji T. and Osawa T. (1982) [114]

Requirement of the core structure of a complex-type glycopeptide for the binding to immobilized lentil- and pea-lectins.

Carbohydrate Research, 110, 283-289

Yamashita K., Hitoi A. and Kobata A. (1983) [72]

Structural determinants of Phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin for oligosaccharides.

Journal of Biological Chemistry, 258, 14753-14755

Yamashita K., Ohkura T., Tachibana Y., Takasaki S. and Kobata A. (1984) [71]

Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformants by hydrazinolysis.

The Journal of Biological Chemistry, 259, 10834-10840

Yanagimachi R. and Nicolson G.L. (1976) [76]

Lectin-binding properties of hamster egg zona pellucida and plasma membrane during maturation and preimplantation development.

Experimental Cell Research, 100, 249-257

Yogeewaran G., Sebastian H. and Stein B.S. (1979) [66]

International Journal of Cancer, 24, 193-202

Yogeeswaran G. and Salk P.C. (1981) [66, 71]

Metastatic potential is positively correlated with cell-surface sialylation of cultured murine tumor cell lines.

Science, 212, 1514-1516

Yoshima H., Takasaki S. and Kobata A. (1980) [63]

The asparagine-linked sugar chains of the glycoproteins in calf thymocyte plasma membrane.

Journal of Biological Chemistry, 255, 10793-10804

Young C.W., Schochetman G. and Karnovsky D. (1967) [39, 41]

Hydroxyurea induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis.

Cancer Research, 27, 526-534

