

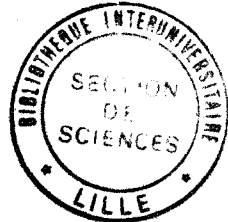
50376
1994
221

50376
1994
221

50376
1994
221

N° d'ordre:

**UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**



THÈSE

présentée par

Olivier Cuillier

pour l'obtention du grade de

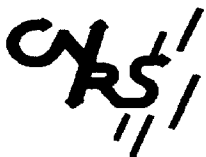
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

*Sciences de la Vie et de la Santé
spécialité: biochimie*

**"Isolement et caractérisation structurale de glycoconjugués du
méconium de Nouveau-né.
Relation avec les antigènes associés aux tumeurs"**

soutenue le 27 mai 1994 devant la commission d'examen

Président: Professeur André Verbert
Rapporteurs: Docteur Jacques Portoukalian
Docteur Anthony Corfield
Examineurs: Professeur émérite Jean Montreuil
Docteur Jean-Claude Michalski



**LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S N° 111**



Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte de Recherche n°111 du CNRS, directeur: professeur André Verbert) sous la direction de Jean-Claude Michalski et Gérard Strecker, directeurs de recherches à l'INSERM et au CNRS. Il a bénéficié d'un co-financement paritaire du Centre National de la Recherche Scientifique et de la Région Nord-Pas de Calais.

*“ être conscient que l'on est ignorant
est un grand pas vers le savoir ”*

benjamin disraëli

à mes parents,
à Éveline,

Ce travail a fait l'objet de plusieurs publications et communications:

publications

“Structural characterization of oligosaccharides released by non-reductive β -elimination of new-born meconium mucins. Alternative method for the large-scale preparation of oligosaccharides antigens useful for the synthesis of neoglycoconjugates”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski and G.Strecker

soumis à Biochemistry

“First evidence of human meconium glycoasparagines”

O.Cuvillier, C.Alonso, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski and G.Strecker

soumis à FEBS Lett.

“Isolation and structural characterization of free neutral oligosaccharides from human meconium”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski and G.Strecker

soumis à Eur.J.Biochem.

communications orales

“Etude des constituants glucidiques du méconium de nouveau-né”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski et G.Strecker

XIXème Forum des Jeunes Chercheurs - Caen, France - juillet 1992

“Nuclear magnetic resonance study of glycolipids immunodetected in human meconium”

O.Cuvillier, J.Portoukalian, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski et G.Strecker

108th Conference of the Gesellschaft für Biologische Chemie and 5th Joint Meeting of the nederlandse vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten and the studiennguppe glykokonjugate der gesellschaft für biologische chemie - Münster, Allemagne - octobre 1993
Biol.Chem.Hoppe-Seyler, 374 (1993) 941

communications par affiche

“Préparation et caractérisation structurale d'oligosaccharides d'intérêt biologique à partir de mucines humaines”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski et G.Strecker

XVIIIème Forum des Jeunes Chercheurs - Tours, France - septembre 1991

“Non reductive β -elimination of O-glycosylproteins”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski et G.Strecker

3th Joint Meeting of the nederlandse vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten and the studienegroupe glykokonjugate der gesellschaft für biologische chemie - Lille, France - septembre 1991

“Caractérisation structurale par spectroscopie RMN d'oligosaccharides d'intérêt biologique isolés de méconium de Nouveau-né”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski et G.Strecker

Congrès de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire - Villepinte, France - décembre 1991

“Isolation and characterization of oligosaccharides released by non-reductive β -elimination from human meconium mucins”

O.Cuvillier, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski and G.Strecker

First Summerschool on Glycobiology and Glycochemistry - Lausanne, Suisse - juin 1993

“Immunodetection and structural characterization of fetal glycolipids expressed in human meconium”

O.Cuvillier, J.Portoukalian, J.M.Wieruszeski, J.C.Michalski and G.Strecker

GERLI meeting "Glycolipids: function and pathology" - Strasbourg, France - septembre 1993

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

☞ *Définition, origine et composition chimique du méconium*

☞ *Structure chimique des glycoconjugués*

- LES N-GLYCANNES

- LES O-GLYCANNES

- les cores O-glycanniques

- le squelette des O-glycannes

- la périphérie des O-glycannes

- LES GLYCOSPHINGOLIPIDES

☞ *Les glycoconjugués du méconium*

- LES O-GLYCANNES LIBÉRÉS APRÈS β -ELIMINATION

- LES N-GLYCANNES

- LES OLIGOSACCHARIDES LIBRES

- LES GLYCOLIPIDES

- LES TAAS DU MÉCONIUM

☞ *Changements moléculaires des antigènes glucidiques associés au cancer*

- CARACTÉRISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGÈNES PORTÉS PAR LES CHAÎNES DE TYPE 1 ET 2

- chaînes lacto de type 1

- 1. voies normales de synthèse

- 2. voies oncofoetales

- chaînes lacto de type 2

- 1. voies normales de synthèse

- 2. voies oncofoetales

• CARACTÉRISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGÈNES EXCLUSIVEMENT ASSOCIÉS AUX GLYCOLIPIDES

les globosides

1. biosynthèse des globosides
2. voies oncofoetales

les gangliosides

1. biosynthèse des gangliosides
2. voies oncofoetales

• CARACTÉRISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGÈNES EXCLUSIVEMENT ASSOCIÉS AUX GLYCOPROTÉINES

les antigènes T, Tn et sialyl Tn

changements associés à la malignité, rencontrés dans les N-glycannes

• CONCLUSION

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ET RÉSULTATS

⇒ Les glycoprotéines

- article n°1: "structural characterization of oligosaccharides released by non-reductive β -elimination of new-born meconium mucins"

⇒ Les glycoasparagines et oligosaccharides libres

- article n°2: "isolation and structural characterization of free neutral oligosaccharides from human meconium"

- article n°3: "first evidence of human meconium glycoasparagines"

⇒ Les glycolipides

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ABBREVIATIONS

AlINAc: N-Acétallosamine	NeuAc: acide N-Acétalneuraminique
As: asialo	NeuGc: acide N-Glycolalneuraminique
Asn: asparagine	nLc: néolacto
BHK: baby hamster kidney	NMR: nuclear magnetic resonance
Cer: céramide	PBS: phosphate buffered saline
ConA: concavaline A	PNA: peanut agglutinin
COSY: correlated spectroscopy	ppm: parties par million
Fuc: fucose	Sia: acide sialique
Ga: gala	TAA: tumor associated antigens
Gb: globo	TalNAc: N-Acétallosamine
Gal: galactose	TLC: thin layer chromatography
GalNAc: N-Acétalgalactosamine	1D: monodimensionnel
Glc: glucose	2D: bidimensionnel
GlcNAc: N-Acétalglucosamine	
HAMA: human anti-mouse Ig antibody	
HPLC: high performance liquid chromatography	
KDN: keto deoxy nonulosaminic acid	
Lc: lacto	
Lac: lactose	
Le: lewis	
L-PHA: <i>Phaseolus vulgaris</i> leukoagglutinating lectin	
Man: mannose	
ManAc: N-Acétalmannosamine	

INTRODUCTION

La transformation maligne s'accompagne de profondes modifications structurales des glycoconjugués de la membrane cellulaire. Celles-ci sont le résultat de l'expression «anormale» de certaines glycosyltransférases, notamment fucosyl-, sialyl- et glucosaminyltransférases.

Bon nombre de ces substances «oncofoetales» sont apparentées aux structures antigéniques du système de groupe sanguin Lewis (Lewis^X, Lewis^Y, sialyl-Lewis^X, sialyl-Lewis^a, polymères ou hybrides Lewis) ou à leurs précurseurs biosynthétiques.

Dans la pratique, les antigènes oncofoetaux sont mis en évidence au niveau des tumeurs à l'aide d'anticorps monoclonaux produits après immunisation murine par des antigènes purifiés ou en mélange, obtenus de tumeurs ou de lignées cellulaires. L'observation selon laquelle ces antigènes associés aux tumeurs étaient retrouvés en quantité pondéralement plus importante dans certains milieux biologiques tels le lait de Femme ou le méconium de Nouveau-né, a suscité notre programme de recherche consistant en la caractérisation de nouveaux «onco-antigènes», en particulier au niveau des glycolipides et mucines d'origine foetale. L'objectif de cette étude étant la préparation en grande quantité de ces oligosaccharides porteurs d'épitopes associés aux tumeurs, dans l'intention de produire des anticorps monoclonaux «anti-sucres» en vue de leur utilisation future dans l'immunodiagnostic ou l'immunothérapie des cancers.

Nous nous sommes intéressé à l'isolement du matériel glucidique du méconium et plus particulièrement aux mucines et aux glycolipides. Au-cours de ce «screening» des glycoconjugués méconiaux, nous avons associé différentes techniques chimiques, en particulier une méthode originale de libération des chaînes O-glycanniques, chromatographiques et immuno-chimiques pour l'isolement des antigènes glucidiques ainsi qu'à leur caractérisation structurale par la résonance magnétique nucléaire.

L'exposé de ces travaux sera précédé par une revue générale au-cours de laquelle nous définirons:

- le méconium et ses origines;
- la chimie des glycoconjugués susceptibles d'être rencontrés dans le méconium;
- les structures qui y ont été isolées ou détectées à ce jour;
- enfin, un chapitre sera consacré aux antigènes associés aux tumeurs, et plus particulièrement à leur biosynthèse, leurs mécanismes d'expression dans les tumeurs et le cas échéant à leur application diagnostique.

GENERALITES

DEFINITION, ORIGINE ET COMPOSITION CHIMIQUE DU MECONIUM

Le méconium se définit classiquement comme les matières accumulées dans l'intestin du fœtus, à compter de la fin du troisième mois de gestation et que l'enfant évacue immédiatement après la naissance.

L'aspect macroscopique du méconium se modifie au fur et à mesure de sa progression dans l'intestin au-cours de la vie intra-utérine. A la naissance, il se présente sous la forme d'une pâte homogène, visqueuse, d'une coloration olivâtre, sans odeur et de saveur fade.

Microscopiquement, il est classique de distinguer les éléments d'origine gastro-intestinale et hépato-biliaire, des éléments d'origine amniotique:

- ☛ les éléments d'origine **gastro-intestinale** sont essentiellement représentés par le mucus et les cellules épithéliales desquamées;
- ☛ les éléments d'origine **hépato-biliaire** sont représentés par des éléments cellulaires provenant de la desquamation des voies biliaires, par des éléments cristallins, en particulier cristaux de bilirubine;
- ☛ les éléments d'origine **amniotique** ne font leur apparition dans le méconium qu'à partir du début du 9ème mois. Ils sont représentés en particulier par des poils foetaux et par des éléments cutanés provenant de l'épiderme, qui forment les corps méconiques blancs visibles à l'oeil nu dans le méconium à l'état frais (pour revue: Harries, 1978).

S'agissant de la composition chimique du méconium, celle-ci est la suivante:

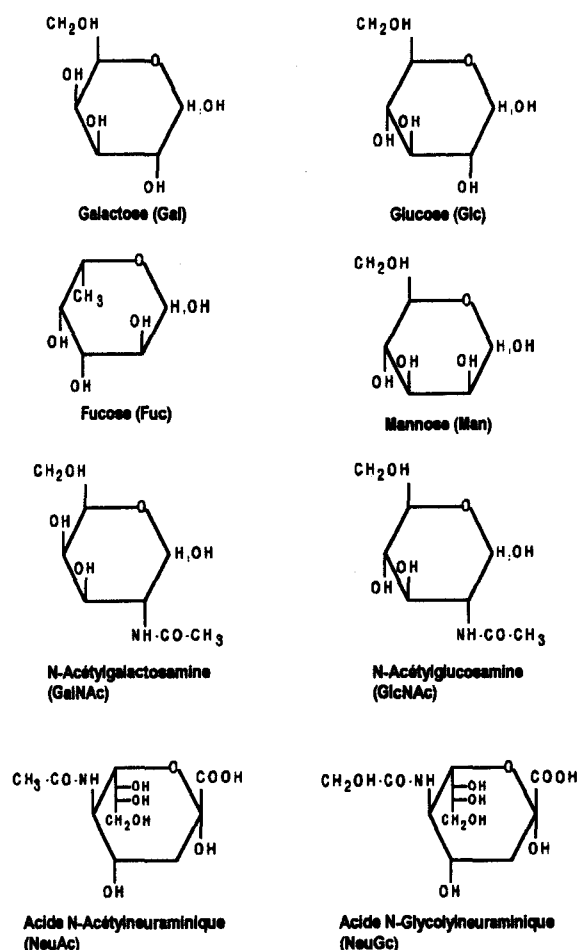
- teneur en eau: comprise entre 70 et 80%;
- composition centésimale de la matière sèche:
 - 80% de substances glucido-protidiques,
 - 8% de lipides et apparentés,
 - 7% de protéines,
 - 4% d'éléments minéraux,
 - 1% divers dont pigments biliaires, vitamines, métaux rares...

STRUCTURE CHIMIQUE DES GLYCOCONJUGUES

Les glycoconjugués forment un groupe très hétérogène de composés qui contiennent tous une partie glucidique liée de façon covalente à une protéine (O- et N-glycannes) ou à un lipide (glycosphingolipides). La caractéristique commune à toutes ces classes de glycoconjugués est leur formidable diversité structurale. Celle-ci est un élément fondamental pour les hypothèses autorisant ces chaînes glycaniques à d'importantes fonctions biologiques. Les structures et abréviations des monosaccharides majeurs rencontrés dans les glycoconjugués sont rassemblés dans le tableau 1 ci-contre.

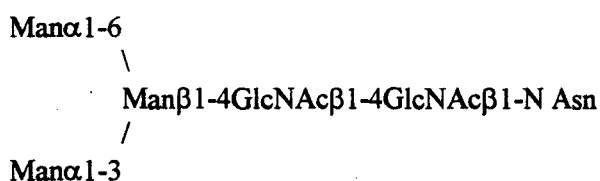
tableau 1

structures et abréviations des principaux monosaccharides trouvés dans les glycoconjugués



LES N-GLYCANNES

Schématiquement, tous les N-glycannes (pour revue: Cummings,1993) possèdent un core commun, le trimannosyl-di-N-Acetylchitobiose lié à un résidu asparaginyll:



C'est la nature de la partie externe, substituant ce noyau pentasaccharidique, qui va déterminer les principales classes de N-glycannes (Montreuil, 1982).

Le **type oligomannosidique** (figure 1A, page 13) dont le core n'est substitué que par des résidus de mannose variant dans leur position et leur nombre: la structure minimale $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ dite "Man₅" pouvant être substituée par 1 à 4 nouveaux résidus $\alpha 1-2$ mannosyl pour aboutir à la structure limite "Man₉".

Les glycannes de **type complexe** (ou N-Acétyllactosaminique) dérivent de la substitution des résidus α -mannosyl du core par 1 à 6 unités de type N-Acétyllactosaminique, $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$, générant des structures mono- jusqu'à hexa-antennées (figure 1B, page 13). Plus que l'expression de N-Acétyleglucosamine dite intercalaire et de fucose, respectivement liés aux résidus β -mannosyl et de N-Acétyleglucosamine; ce sont surtout les substitutions des antennes qui vont contribuer à la grande hétérogénéité des N-glycannes de type complexe. D'une part, ces antennes sont fréquemment sialylées par de l'acide N-Acétyleuraminique lié en $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$ aux galactoses terminaux, voire polysialylées, particulièrement dans les molécules d'adhésion aux cellules nerveuses (N-CAM), sous la forme d'un enchaînement $(\text{NeuAc}\alpha 2-8)_{8-12}\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}$ (Finne, 1982). D'autre part, la fucosylation des monosaccharides constitutifs de l'unité N-Acétyllactosaminique conduit à la formation de déterminants de groupes sanguins ABH et Lewis (Finne et al, 1989). Enfin, la polymérisation des unités N-Acétyllactosamine $(3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)_n$ où $n = 1$ à 50, conduit à des glycannes regroupés sous un terme générique commun avec certains O-glycannes et glycolipides, les **polylactosaminoglycannes** (pour revue: Kobata et Takasaki, 1992). Ces glycannes existent sous forme linéaire ou branchée (figure 2 ci-après), représentant respectivement les structures des antigènes i et I (Feizi, 1980).

forme linéaire



forme branchée



figure 2

les deux types de structures de répétition trouvées dans les polylactosaminoglycannes

Comme les autres N-glycannes de type complexe, ces polylectosaminoglycannes peuvent exprimer des déterminants ABH et Lewis (Krusius et al,1978; Fukuda et al,1984a). Les résidus galactosyls terminaux peuvent aussi être sialylés en α 2-3 ou 2-6, de même la N-Acétyleglucosamine interne à l'unité de répétition peut être fucosylée pour donner naissance à des glycannes dits polyfucosylés (Finne et al,1989).

Quant au dernier type de N-glycannes, ceux-ci résultent de la combinaison sur le même glycanne d'une structure de type oligomannosidique et d'une structure de type N-Acétylelactosaminique, c'est pourquoi ils sont appelés N-glycannes de type hybride (figure 1C, page 13).

Cette description est sans doute sommaire, mais elle nous prouve néanmoins la grande disparité structurale existant au sein de ces N-glycannes.

LES O-GLYCANNES DE TYPE MUCINE

Outre la N-Acétylegalactosamine impliquée dans la liaison sucre-protéine, les O-glycannes de type mucine contiennent communément de la N-Acétyleglucosamine, du galactose, du fucose et des acides sialiques divers. Gal, GlcNAc peuvent en outre se trouver sous forme sulfatée, et de ce fait contribuent avec l'acide sialique à l'acidité de beaucoup d'oligosaccharides de type mucine.

En dépit de leur complexité apparente due à une grande variabilité structurale, les chaînes O-glycanniques de type mucine se composent de trois régions distinctes (Hounsell & Feizi,1982), à savoir:

- le noyau ou "core" incluant la liaison avec l'axe peptidique,
- le squelette ou "backbone", région charnière qui peut être linéaire ou branchée,
- la périphérie, région terminant la chaîne glycanne (figure 3 ci-contre).

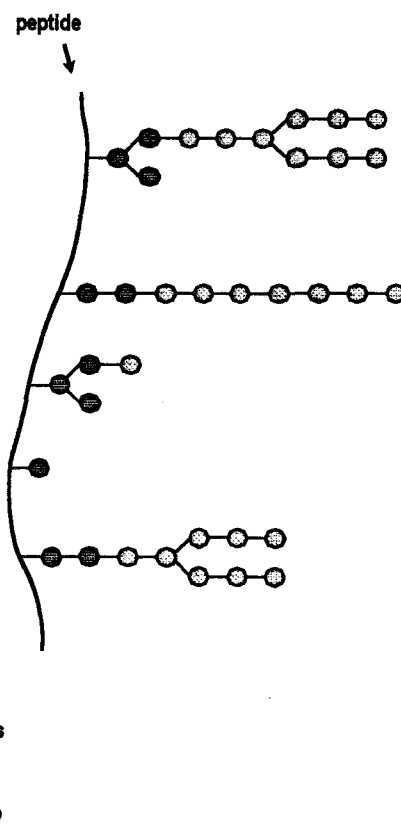


figure 3

représentation schématique des chaînes glucidiques des glycoprotéines de type mucine (d'après Hounsell et Feizi,1982)

Les cores O-glycanniques (tableau 2, page 17)

L'action d'une N-Acétylgalactosaminyltransférase (McGuire et Roseman, 1967) sur un résidu sérine ou thréonine d'un peptide accepteur conduit à la formation de la séquence GalNAc- α -Ser/Thr, la seule commune à toutes les chaînes O-glycanniques de type mucine. A partir de celle-ci, plusieurs routes sont possibles pour la biosynthèse menant à la formation des principaux cores (figure 4, page 18).

Le core de classe 1, Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr, le plus répandu, a été découvert le premier (Carlson, 1968) dans les mucines sous-maxillaires de Porc. Il constitue le déterminant antigénique T (antigène Thomsen-Friedenreich) reconnu par PNA, la lectine de cacahuète (Lotan, et al, 1975);

le core de classe 3, GlcNAc β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr, est peu fréquent;

les cores de classes 2 et 4, Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc- α -Ser/Thr et GlcNAc β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc- α -Ser/Thr, dérivent de la substitution des cores de classes 1 et 3 par un résidu de N-Acétylglucosamine lié en β 1-6. Les deux réactions sont catalysées par la même enzyme: la β 6-N-Acétylglucosaminyltransférase (Brockhausen et al, 1985), laquelle nécessite la substitution en C₃ du résidu de N-Acétylgalactosamine par du galactose ou de la N-Acétylglucosamine. En effet, cette enzyme obéit à ce que l'on appelle la règle du "3 avant 6", c'est à dire que le carbone 3 doit être substitué avant le carbone 6 (Schachter, 1986).

Ce phénomène est similaire à celui rencontré lors de la formation du déterminant antigénique I, au cours duquel la β 6-N-Acétylglucosaminyltransférase (identique à celle qui synthétise les cores 2 et 4) n'agit que sur la structure GlcNAc β 1-3Gal β 1-R pour former l'embranchement GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-R (Piller et al, 1984). D'autres cores beaucoup plus rares ont été décrits:

Le core de classe 5, GalNAc α 1-3GalNAc- α -Ser/Thr, montre une distribution très restreinte puisque chez l'Homme, il n'a été trouvé que dans les sécrétions intestinales foetales (Hounsell et al, 1985) et l'adénocarcinome rectal (Kurosaka et al, 1983). Une α 3-N-Acétylgalactosaminyltransférase, isolée de tumeurs intestinales humaines, est capable de synthétiser ce core *in vitro* (Kurosaka et al, 1985);

le core de classe 6 (figure 4, page 18), GlcNAc β 1-6GalNAc- α -Ser/Thr, n'a été isolé que dans des glycoprotéines humaines. Ceci suggère que ces tissus humains possèdent une β 6-N-Acétylglucosaminyltransférase agissant directement sur le substrat GalNAc- α -Ser/Thr, n'obéissant pas à la règle du "3 avant 6", donc différente de celle synthétisant les cores 2 et 4. Effectivement, une telle activité, ne nécessitant pas la substitution en C₃ de la N-Acétylgalactosamine, a été décrite dans des

tissus ovariens humains (Yazawa et al,1986). Ceci excluerait donc l'hypothèse selon laquelle ce core proviendrait d'une dégradation des cores 2 ou 4. En outre, selon Schachter et Brockhausen (résultats non publiés), la faible abondance du core de classe 6 pourrait être due à l'activité $\beta 3$ -galactosyltransférase qui convertirait celui-ci en core 2;

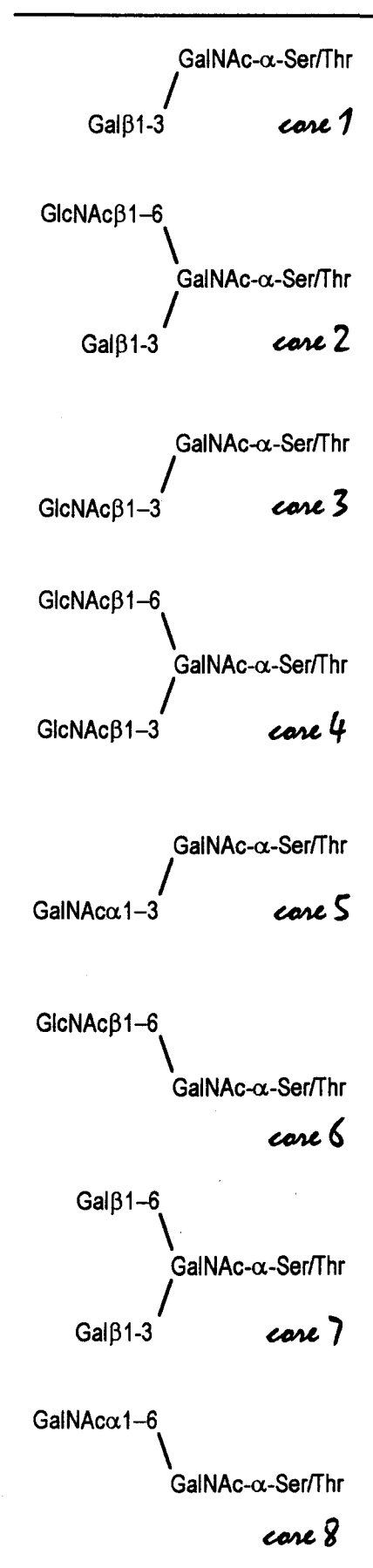
le core de classe 7, Gal $\beta 1-3$ [Gal $\beta 1-6$]GalNAc- α -Ser/Thr, n'a été rapporté que dans les mucines gastriques humaines (Slomiany et al,1984);

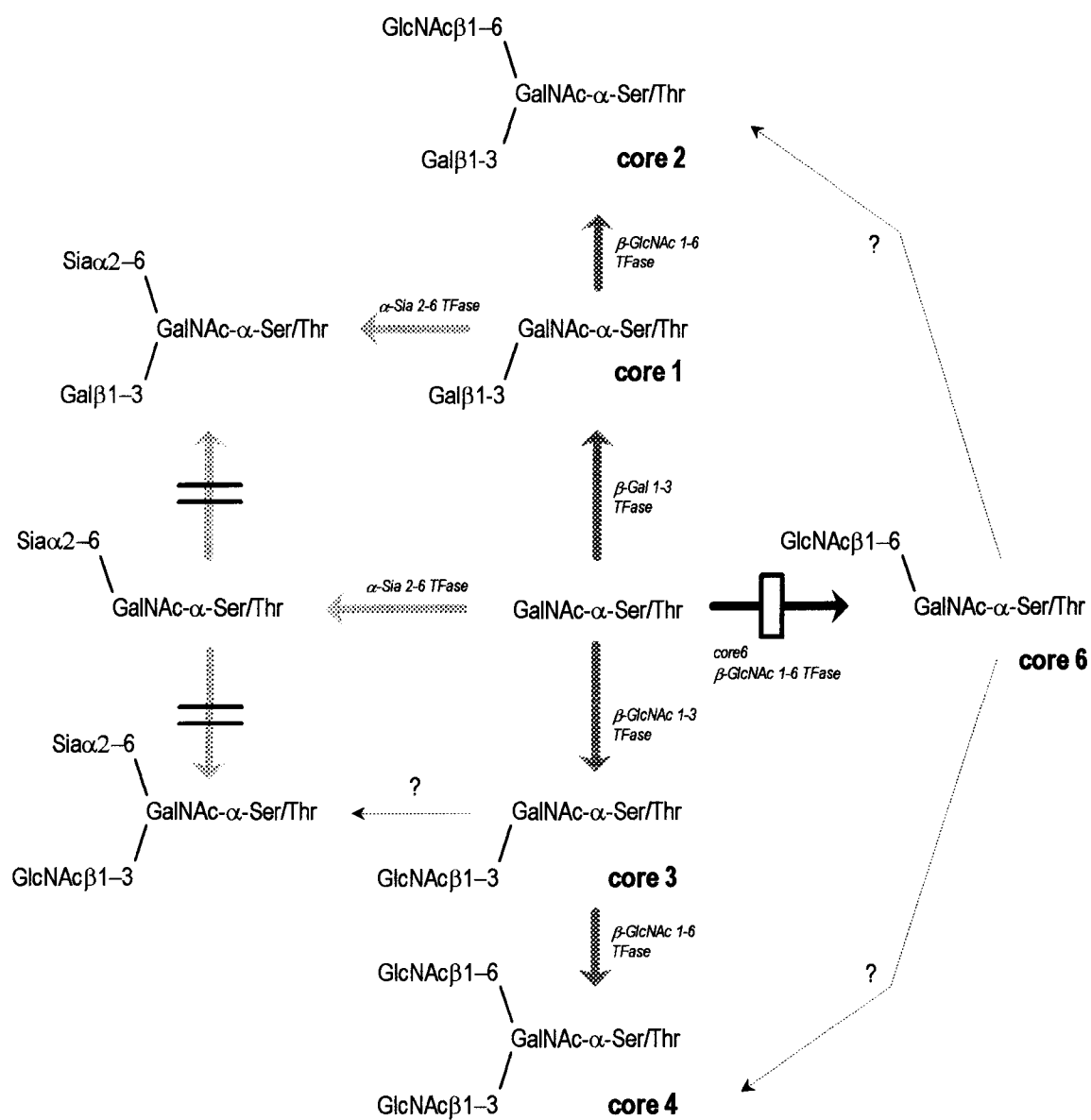
enfin le disaccharide GalNAc $\alpha 1-6$ GalNAc- α -Ser/Thr ou core de classe 8, isolé à ce jour que des mucines sous-maxillaires bovines (Chai et al,1992). Comme nous venons de le voir, la N-Acétylgalactosamine est habituellement liée en $\alpha 1-3$ (core de classe 5), ceci suggérerait l'existence dans ce cas d'une N-Acétylgalactosaminyltransférase privilégiant la liaison $\alpha 1-6$.

Dans de nombreuses mucines, un résidu d'acide sialique (NeuAc, NeuGc ou KDN) peut substituer la séquence GalNAc- α -Ser/Thr, sous l'action d'une $\alpha 2-6$ sialyltransférase (Carlson et al,1973). Le disaccharide résultant Sia $\alpha 2-6$ GalNAc- α -Ser/Thr ne peut alors plus servir comme accepteur pour les enzymes responsables de la formation des cores 1 et 3 (Sadler et al,1979) illustrant le mécanisme "Go-NoGo" postulé par Schachter en 1986. Par ailleurs, des séquences polysialylées peuvent être formées à partir de ce résidu sialylé, en particulier dans les oeufs de poissons (pour revue: Troy,1992).

tableau 2

les cores O-glycanniques de type mucine
(classification selon Schachter et Williams, 1982)





légende





-  réaction impossible
-  mécanisme Go / No Go
-  mécanisme No Go / Go
-  réaction lente

figure 4

schéma de biosynthèse des principaux cores O-glycanniques
(d'après Schachter et Brockhausen, 1992)



Le squelette des O-glycannes

L'addition de résidus de galactose et de N-Acétyleglucosamine sur les cores (à l'exception du type 8) conduit à la formation du squelette des O-glycannes organisé en 2 types de séquences (Watkins, 1980):

Gal β 1-3GlcNAc (type 1 ou lacto) et Gal β 1-4GlcNAc (type 2 ou néolacto).

Ces séquences, pouvant être répétitives ou former des structures ramifiées, diffèrent de celles incluses dans les poly-N-Acétillactosamines des N-glycannes de type complexe, et ce en plusieurs points.

☛ En premier lieu, les unités Gal β 1-3GlcNAc et Gal β 1-4GlcNAc sont trouvées comme séquences répétitives dans les O-glycannes (Rovis et al, 1973) tandis que seulement les chaînes de type 2 sont répétées et la chaîne de type 1 trouvée en position terminale non réductrice dans les N-glycannes (Yamashita et al, 1989);

☛ deuxièmement, toutes les unités disaccharidiques sont allongées via une liaison β 1-3. Néanmoins, des séquences linéaires Gal β 1-4GlcNAc β 1-(6Gal β 1-4GlcNAc β 1)₁₋₄-6Gal ont été trouvées dans les chaînes glycaniques de mucines isolées du lait humain (Hanisch et al, 1989). La β 6-N-Acétyleglucosaminyltransférase impliquée serait donc une enzyme d'extension et non de branchement comme celle responsable de la formation des cores 2 et 4, et du déterminant antigénique I;

☛ troisièmement, aucune séquence de répétition n'a été trouvée sur le côté GlcNAc β 1-6 des O- et N-glycannes possédant le branchement GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal. Cependant, de telles unités peuvent exister à partir de la β 1-6 N-Acétyleglucosamine du core de type 2 (Fukuda et al, 1986; Hanisch et al, 1989).

Notons toutefois que la présence d'unités disaccharidiques de type 1 ou 2 n'est qu'une règle générale dans la formation des squelettes O-glycaniques. Certains d'entre eux font ainsi exception en n'étant formés que par un unique résidu de N-Acétyleglucosamine lié en β 1-3 ou β 1-6 au galactose des cores 1 (Lhermitte et al, 1991) ou 2 (Rana et al, 1984; Chandrasekaran et al, 1984).

La périphérie des O-glycannes

Les substitutions rencontrées sur les séquences Gal β 1-3GlcNAc et Gal β 1-4GlcNAc sont très souvent similaires à celles trouvées sur les antennes des N-glycannes de type complexe ou dans certains glycolipides. Les structures les mieux connues sont celles qui possèdent les activités de groupe sanguin

ABH et Lewis, et ont été déterminées grâce au remarquable travail de Morgan, Watkins et Kabat sur les glycoprotéines de kystes ovariens (Watkins, 1980).

Les chaînes terminales de type 1 (figure 5A, page 21) peuvent être fucosylées sur les résidus de galactose ou de N-Acétyleglucosamine définissant respectivement les antigènes H et Lewis ^a (Rege et al, 1964a et b). La présence simultanée des deux résidus de fucose correspondant à l'antigène Lewis ^b (Marr et al, 1967). Les structures des déterminants antigéniques A et B diffèrent du groupe H, seulement par la nature du sucre terminal non réducteur qui le substitue (Painter et al, 1965): N-Acétylegalactosamine pour l'antigène A et galactose pour l'antigène B.

Comme pour les chaînes de type 1, les déterminants antigéniques ABH sont retrouvés sur les chaînes terminales de type 2 (figure 5B, page 21), mais la substitution de la N-Acétyleglucosamine par du fucose définit de nouveaux antigènes (Hakomori et Kobata, 1974):

- l'antigène X : $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc-R}$;
- l'antigène Y : $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc-R}$.

Exceptée la présence des monosaccharides constitutifs des antigènes ABH et Lewis, de nombreuses autres substitutions plus ou moins fréquentes ont été décrites, notamment par l'acide sialique ou les groupements sulfates (figure 5, page 21).

Une singularité des chaînes O-glycanniques est la glycosylation terminale directement exprimée sur les cores, et non sur les seules unités N-Acétylelactosaminiques du squelette. Les monosaccharides et les liaisons impliqués sont aussi variés que pour une terminaison sur chaînes de type 1 ou 2, contribuant à accroître la déjà grande hétérogénéité des O-glycannes. La fucosylation y est la substitution la plus courante. Celle-ci s'exprime en particulier sur le résidu galactosyl du chaînon $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc-}\alpha\text{-R}$ des cores 1 et 2, en association avec de l' $\alpha 1-3$ galactose ou $\alpha 1-3$ N-Acétylegalactosamine, définissant ainsi des déterminants groupaux ABH. Cette séquence $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc-}\alpha\text{-R}$ dite chaîne de type 3 n'est, par ailleurs, pas restreinte aux O-glycannes puisqu'elle représente l'extrémité terminale non réductrice de certains glycolipides (Clausen et al, 1985a).

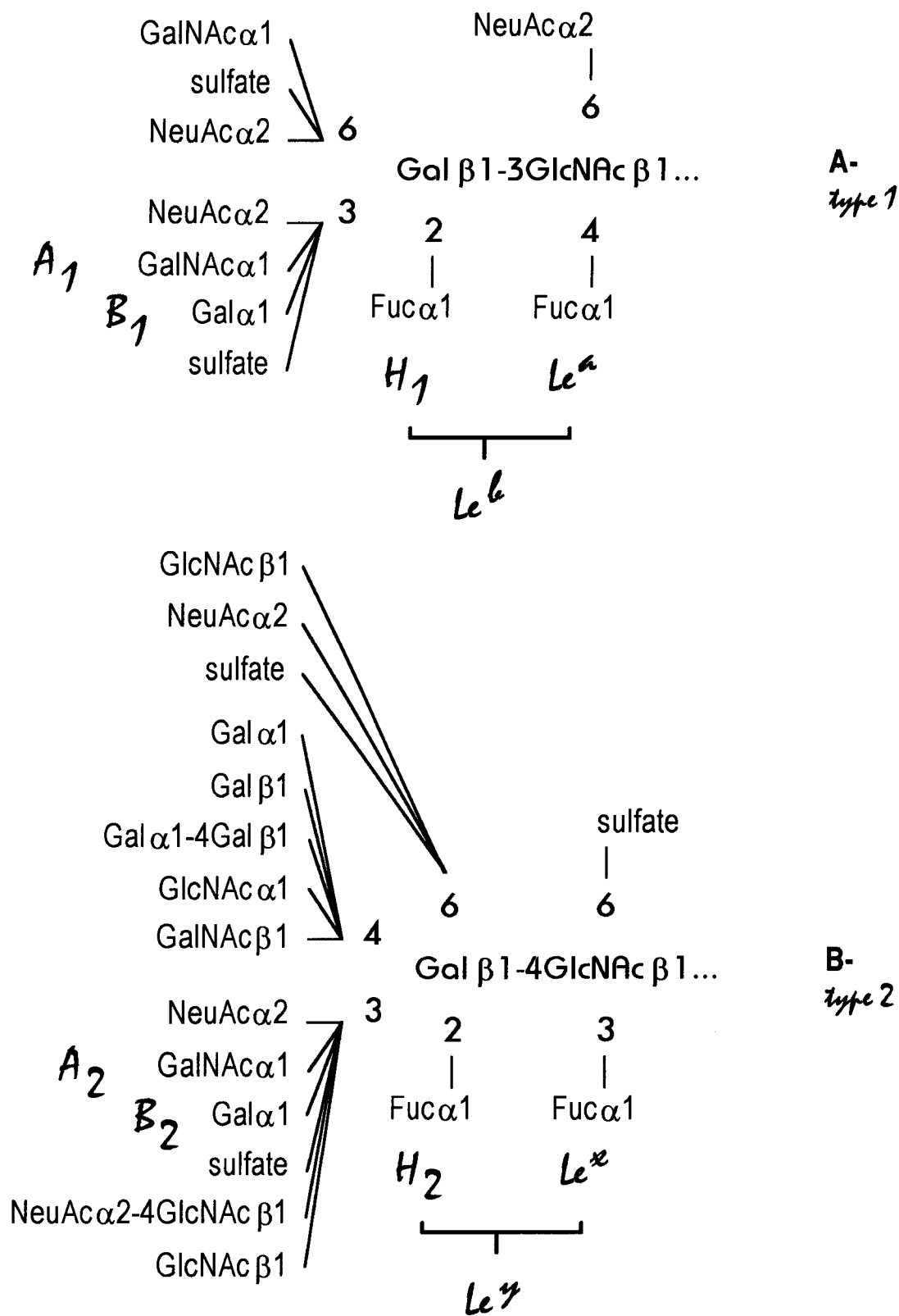


figure 5

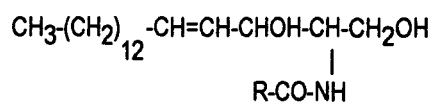
substitutions trouvées sur les chaînes terminales de type 1 et 2 des O-glycannes



LES GLYCOSPHINGOLIPIDES

Les glycosphingolipides ou pour simplifier les glycolipides (pour revue: Kundu,1992) sont des molécules amphiphiles formées d'une partie glycanique liée glycosidiquement à une céramide.

La **céramide** (figure 6 ci-contre), résultant de l'association d'un amino-alcool à longue chaîne carbonée (généralement la sphingosine) avec un acide gras de longueur variable (C₁₆ à C₂₄) via une liaison amide, constitue la partie hydrophobe des glycolipides. Celle-ci présente une microhétérogénéité structurale inhérente à ses deux composants, dont les plus rencontrés sont rassemblés dans le tableau 3 ci-après.



(R: acide gras à longue chaîne)

figure 6

structure générale d'une céramide
(base sphingoïde: la sphingosine)

tableau 3

bases sphingoides et acides gras constituant la céramide

bases sphingoides (a)	acides gras (b)
sphinganine (d18:0)	palmitique (16:0)
sphingosine (d18:1)	stéarique (18:0)
phytosphingosine (t18:0)	hydroxystéarique (h18:0)
eicosasphingosine (d20:1)	arachidique (20:0)
	béhénique (22:0)
	lignocérique (24:0)
	cérébronique (h24:0)
	nervonique (24:1)

(a) abréviations concernant les bases sphingoides
nombre d'atomes de carbone : nombre d'insaturations
les lettres d et t pour dihydroxy et trihydroxy
respectivement

(b) abréviations concernant les acides gras
nombre d'atomes de carbone : nombre d'insaturations
la lettre h pour les substitutions α-hydroxylées

La partie hydrophile de **nature oligosaccharidique** est formée d'une unité interne de lactose (Galβ1-4Glc) liée à la fonction alcool primaire de la céramide (figure 6 ci-dessus), exception faite d'une minorité de glycolipides possédant un résidu de galactose en position terminale réductrice (série gala) et du fucosylα1-céramide isolé de tumeurs du côlon (Watanabe et al,1976b).

Ainsi, l'addition d' α 1-4 galactose et de β 1-4 N-Acétalgalactosamine conduit respectivement à la formation des glycolipides des séries **globo** et **ganglio**. La N-Acétalglucosamine peut également substituer le lactosylcéramide. Le résultat: $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Glc}\beta$ 1-Cer est ensuite galactosylé en β 1-3 ou β 1-4, menant aux séries **lacto** et **néolacto** (figure 7 ci-dessous).

Les deux dernières séries contiennent une séquence oligosaccharidique identique aux chaînes extérieures des N-glycannes de type complexe et O-glycannes de type mucine (voir paragraphes précédents). Comme ces glycoprotéines, les séries lacto et néolacto glycolipidiques expriment des activités ABH, Ii et Lewis (Hakomori et Young, 1983b). De même, les glycolipides de la série globo (encore appelés globosides) peuvent également posséder des déterminants ABH, via la chaîne porteuse $\text{Gal}\beta$ 1-3 $\text{GalNAc}\beta$ -R dite de type 4 (Oriol et al, 1986), épitope de l'antigène SSEA-3 (tableau 4, page 23). La biosynthèse des globosides sera développée dans le chapitre consacré aux antigènes associés aux tumeurs (pages 63-64).

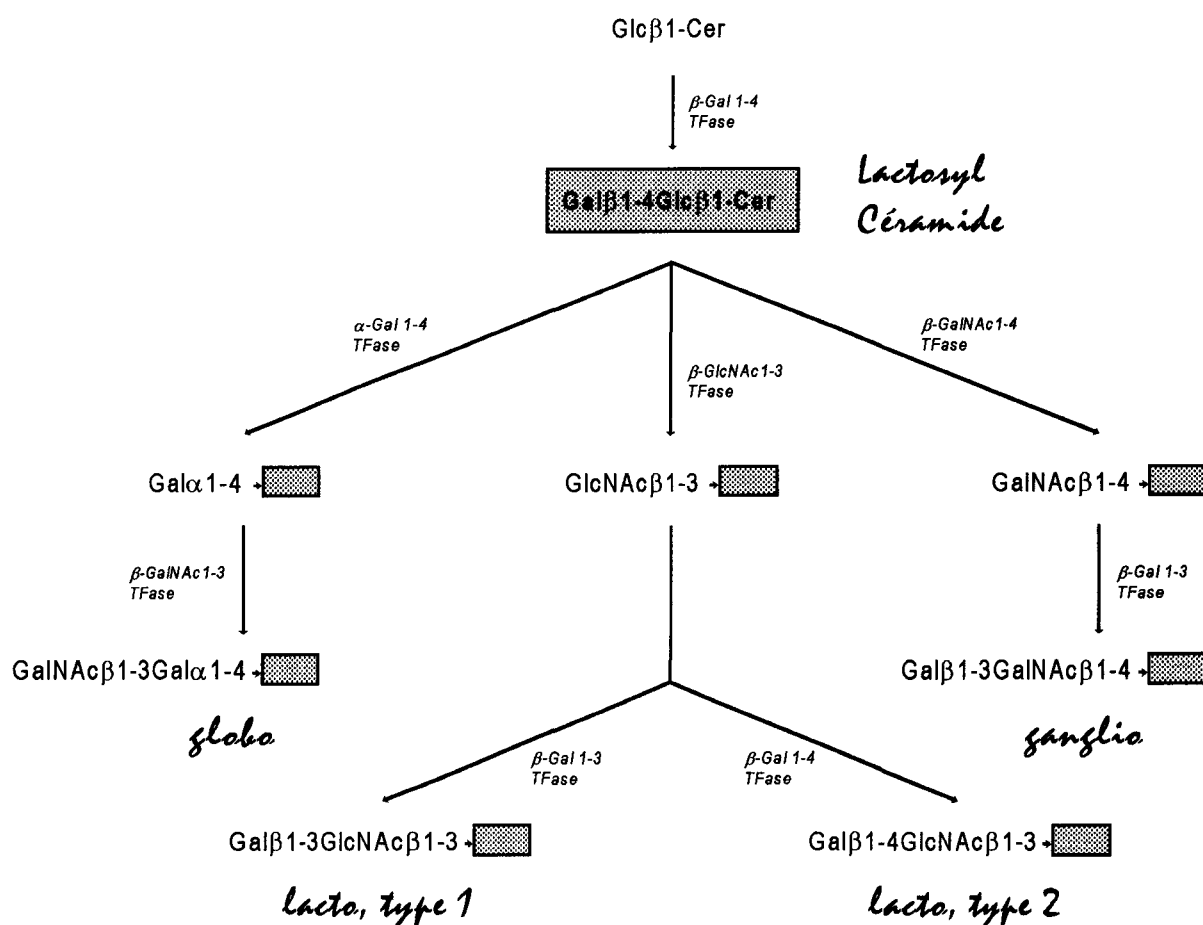


figure 7

voies de biosynthèse des principales séries glycolipidiques

Des polyglycosylcéramides complexes possédant parfois jusqu'à 60 résidus monosaccharidiques par molécule, et particulièrement présents dans les membranes érythrocytaires humaines, ont été mis en évidence (Kościelak et al,1976). Ces chaînes glucidiques possèdent, comme pour les autres «polylactosaminoglycannes» rencontrés dans les O- et N-glycannes, des unités répétitives de N-Acétyllactosamine. Les structures de ces mégaglycolipides expriment aussi des déterminants ABH, li mais pas Lewis.

Les glycolipides contenant une ou plusieurs molécules d'acide sialique sont trivialement appelés **gangliosides** (Klenk,1935). Au sein de cette superfamille coexistent d'une part, des glycolipides d'origine neutre présents sous forme sialylée et d'autre part, les glycolipides de la série ganglio - par nature - acides.

Ainsi donc, les épitopes des séries globo ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1\text{-R}$), lacto ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1\text{-R}$) et néolacto ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-R}$) présentent-ils une sialylation de terminaison traduite par l'expression très majoritaire de $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1\text{-R}$. La sialylation en $\alpha 2-6$ y est rare (non présente dans la série lacto), ceci contrairement aux glycoprotéines. L'addition d'un deuxième résidu d'acide sialique lié en $\alpha 2-3$ au résidu subterminal (exception faite de la série néolacto), ou lié en $\alpha 2-8$ sur le résidu sialyl déjà présent conduit à la formation de structures disialylées.

Dans la série ganglio, dont les principales structures sont rassemblées dans le tableau 5 (page 27), la sialylation est un phénomène omniprésent. L'étape clef de leur biosynthèse (pour revues: Basu et al,1980; Van Echten et Sandhoff,1993) est le transfert d'acides sialiques sur le lactosylcéramide. Le premier est additionné en $\alpha 2-3$ sur le galactose, les second et troisième le sont par une liaison $\alpha 2-8$ sur l'acide sialique précédent (figure 8, page 26). A partir des GM_3 ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$), GD_3 ($\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$) et GT_3 ($\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$) ainsi formés, de la N-Acétalgalactosamine et du galactose sont additionnés. Les résidus de galactose externes de ces trois lignées de gangliosides sont également sialylés sous 2 formes: $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}$ et $\text{NeuAc}\alpha 2-8\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}$.

Par ailleurs, les gangliosides de la série ganglio sont aussi synthétisés par une autre voie dite Handa-Burton (1969). Quand $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$ (gg_4 ou asialo- GM_1) est formé sans sialylation à partir du lactosylcéramide, son galactose externe peut être sialylé le premier en $\alpha 2-3$, et le

résidu N-Acétylgalactosamine subterminal est alors sialylé en α 2-6 (GM_{1b} et GD_{1 α}). Ces deux acides sialiques de sites distincts peuvent aussi être sialylés en α 2-8 (GT_{1 β} et GQ_{1 β}).

Généralement, l'acide sialique est de type N-Acétylneuraminique. Cependant, hormis du KDN récemment trouvé dans le GM₃ et le GD_{1a} (Song et al, 1991 et 1993), de l' α 2-3NeuGc peut être exprimé en lieu et place de son homologue N-Acétylé dans les séries néolacto et ganglio. Cette structure, normalement absente chez l'homme mais présente en faible quantité dans certaines tumeurs (Higashi et al, 1984), possède une activité antigénique de type Hanganutziu-Deicher .

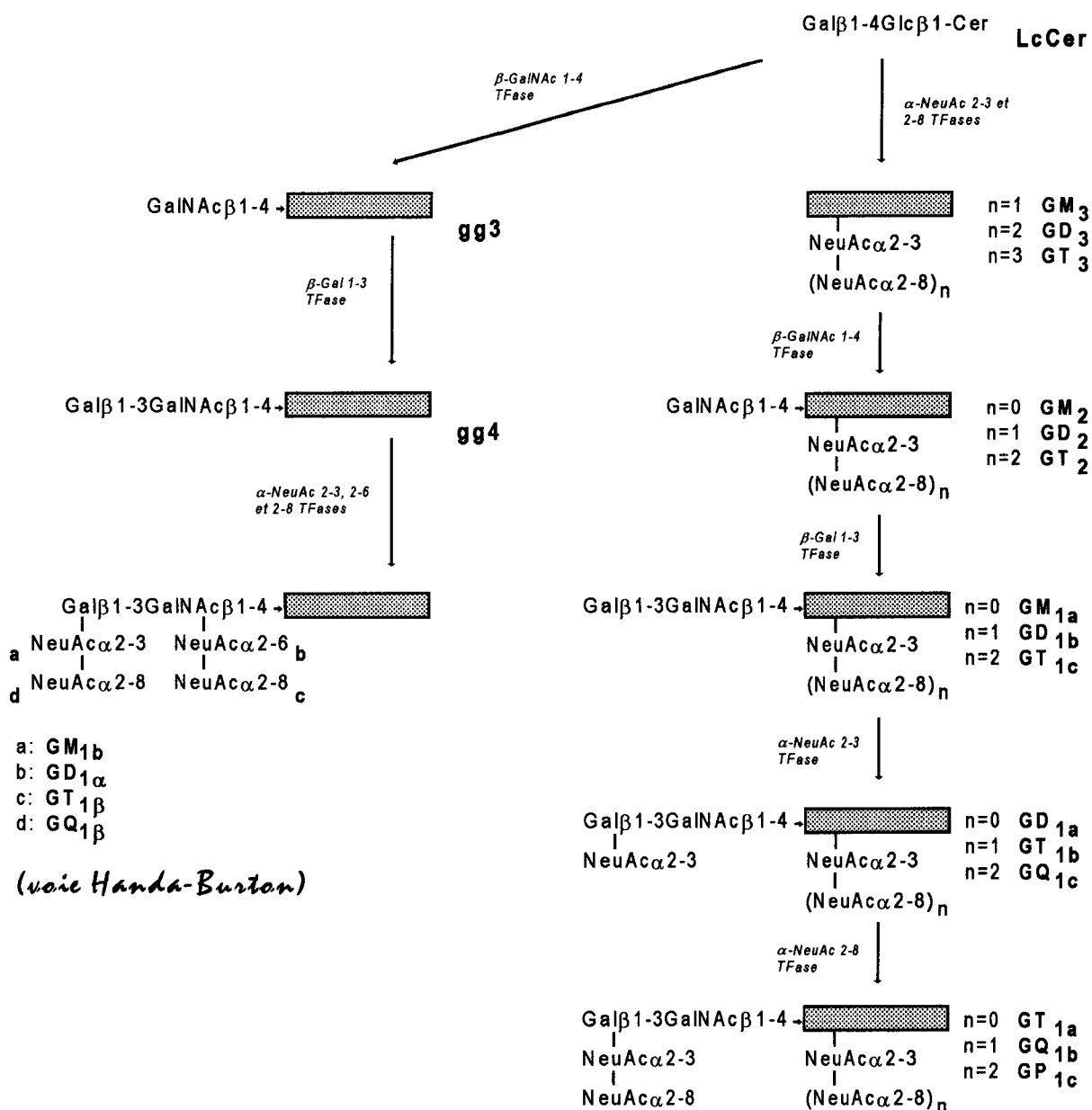


figure 8

biosynthèse des gangliosides (série ganglio)
 les symboles utilisés sont basés sur la nomenclature de Svennerholm (1963)

tableau 5

les principaux gangliosides

structure	désignation IUPAC-IUB (a)	symbole (b)
NeuAc α 2-3Gal β 1-Cer	I ³ NeuAc α -GalCer	GM ₄
R-Galβ1-4Glcβ1-Cer		
R = NeuAc α 2-3	II ³ NeuAc α -LacCer	GM ₃
R = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₂ -LacCer	GD ₃
R = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₃ -LacCer	GT ₃
GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer		
/		
R		
R = H	Gg ₃	AsGM ₂
R = NeuAc α 2-3	II ³ NeuAc α -Gg ₃ Cer	GM ₂
R = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₂ -Gg ₃ Cer	GD ₂
R = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₃ -Gg ₃ Cer	GT ₂
Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer		
/		
R1		
/		
R2		
R ₁ = H, R ₂ = H	Gg ₄	AsGM ₁
R ₁ = H, R ₂ = NeuAc α 2-3	II ³ NeuAc α -Gg ₄ Cer	GM _{1a}
R ₁ = NeuAc α 2-3, R ₂ = H	IV ³ NeuAc α -Gg ₄ Cer	GM _{1b}
R ₁ = NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-3	II ³ NeuAc α ,IV ³ NeuAc α -Gg ₄ Cer	GD _{1a}
R ₁ = H, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₂ -Gg ₄ Cer	GD _{1b}
R ₁ = H, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₃ -Gg ₄ Cer	GT _{1c}
R ₁ = NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₂ ,IV ³ NeuAc α -Gg ₄ Cer	GT _{1b}
R ₁ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-3	II ³ NeuAc α ,IV ³ (NeuAc α) ₂ -Gg ₄ Cer	GT _{1a}
R ₁ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₂ ,IV ³ (NeuAc α) ₂ -Gg ₄ Cer	UQ _{1b}
R ₁ = NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₃ ,IV ³ NeuAc α -Gg ₄ Cer	GQ _{1c}
R ₁ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3, R ₂ = NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3	II ³ (NeuAc α) ₃ ,V ³ (NeuAc α) ₂ -Gg ₄ Cer	GP ₁

(a) désignation selon les recommandations de la Commission de Nomenclature Biochimique IUPAC-IUB (1977)

(b) les symboles sont basés sur la nomenclature de Svennerholm (1963)

LES GLYCOCONJUGUES DU MECONIUM

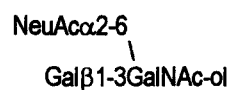
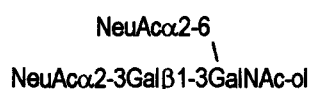
Depuis la caractérisation structurale de substances actives de groupe sanguin dans les glycoprotéines (Fraser et Clamp, 1975; Côté et Valet, 1976) et glycolipides (Karlsson et Larson, 1978) du méconium, de nombreuses études ont été menées sur ces glycoconjugués.

LES O-GLYCANNES LIBERES APRES β -ELIMINATION

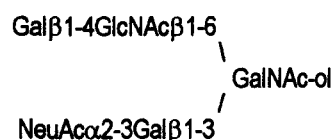
C'est au groupe de Ten Feizi et à notre Laboratoire que nous devons l'essentiel des travaux réalisés sur cette classe particulière de glycoprotéines. Les structures isolées à ce jour sont rassemblées dans le tableau 6 (pages 29-31) et dans un diagramme synoptique présenté en figure 9 (page 32). En 1985, Hounsell et al. ont caractérisé des oligosaccharides-alditols de petite taille; dont les déterminants antigéniques T et Tn déjà connus à l'époque comme associés aux tumeurs (voir chapitre suivant, pages 70-73) et la structure GalNAc α 1-3GalNAc-ol que nous venons d'évoquer précédemment (page 16) et, qui bien qu'apparentée au groupe sanguin A, a été obtenue d'individus présumés de groupe O. Le core de classe 6, GlcNAc β 1-6GalNAc-ol, dont nous discutons l'origine dans le chapitre précédent (pages 16-17), est également présent, mais la découverte de l'oligosaccharide Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-3)GalNAc-ol est particulièrement intéressante car abonderait pour l'existence supposée d'une β 6-N-Acétylglucosaminyltransférase humaine particulière ne nécessitant pas la substitution en 3 du monosaccharide accepteur (voir pages 16-17). Ainsi la séquence Gal β 1-4GlcNAc β 1-6... serait le résultat de l'action d'une enzyme d'élongation et non de branchement. Ceci semble d'ailleurs être corroboré par les résultats obtenus par Hanisch et al. (1989) dans le lait humain (voir page 19). En outre, les autres possibilités pour expliquer la présence de telles structures, telles qu'une dégradation bactériologique ou une décomposition chimique durant la procédure d'isolement, semblent improbables à cause de la quantité trouvée relativement élevée de ces oligosaccharides, de la supposée inexistence de bactéries dans le tractus gastrointestinal foetal et de la plus grande stabilité chimique des liaisons glycosidiques 1-3 par rapport aux 1-6 (Hounsell et al, 1988). D'autres structures penta- et hexasaccharidiques ont également été rapportées (Capon et al, 1989; Hounsell et al, 1989;

STRUCTURES ACIDES

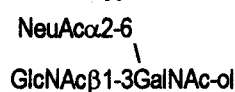
références et remarques

core de type 1Capon et al (1989)
épitope sialyl T

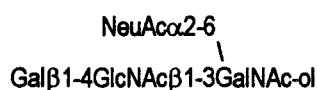
▪

core de type 2

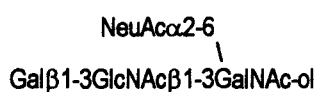
▪

core de type 3

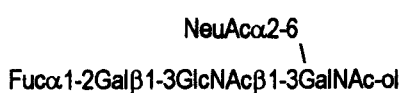
▪



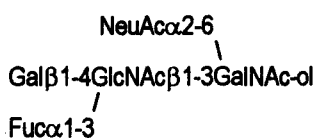
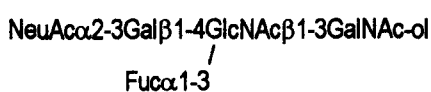
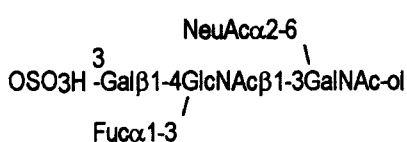
(en mélange)



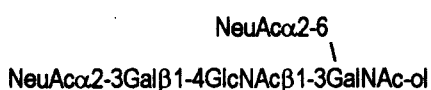
(en mélange)



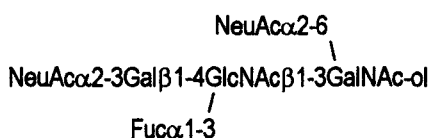
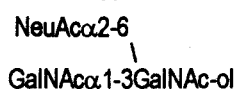
(en mélange)

**épitope Lewis^X**
(en mélange)**épitope sialyl-Lewis^X**
(en mélange)

▪



▪

**épitope sialyl-Lewis^X****core de type 5**

▪

Lawson et al,1991).

S'agissant des glycanes de nature acide, la prospection réalisée au Laboratoire en 1989 a notamment conduit à l'isolement de structures exprimant l'épitope sialyl-Lewis^x et son précurseur biosynthétique: l' α 2-3 sialyl-type 2 dont nous discuterons la nature d'antigènes associés aux tumeurs dans le chapitre suivant. Par ailleurs, la présence de nombreux oligosaccharides mono- et disialylés possédant la N-Acétalgalactosamine terminale réductrice substituée par un résidu d'acide N-Acétalneuraminique, indique vraisemblablement une forte activité de l' α 2-6 sialyltransférase dans la muqueuse intestinale foetale (Capon et al,1989). Enfin, et de façon anecdotique, rappelons que le méconium est jusqu'à présent le seul milieu biologique connu pour posséder les six principaux types de cores O-glycanniques.

LES N-GLYCANNES

Découvert en 1965 par Gold et Freedman, l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) est un marqueur produit par des cancers d'histologie aussi différente que les cancers du poumon, du sein ou gastrointestinaux. Depuis, des glycoprotéines d'antigénicité associée avec le CEA ont été trouvées dans des tissus variés et fluides corporels, en particulier dans les fèces d'adultes normaux et le méconium (Burtin et al,1973). Ces antigènes ont été respectivement dénommés NFA-2 (Normal Fecal Antigen-2) et NCA-2 (Nonspecific Cross-reacting Antigen-2). Partie intégrante d'une série d'études menées sur ces antigènes, l'analyse du NCA-2 méconial par Yamashita et al. (1989) a montré l'existence de 27 chaînes N-glycanniques par molécule antigénique. Face à une telle complexité, une prospection analytique classique ne peut être menée et les structures présentées dans la figure 10 (page 35) sont le résultat de diverses hydrolyses enzymatiques et chimiques destinées à désialyler et défucosyler ces chaînes glycanniques, et sont basées:

- sur les données obtenues à partir de leurs spécificités de fixation avec diverses lectines;
 - sur leur taille, déterminée par passage sur une colonne de tamisage moléculaire pré-calibrée;
- et confirmées par digestions enzymatiques .

Enfin, dans le but d'obtenir des données sur la nature des liaisons fucosyl et sialyl, une méthylation du matériel de départ a indiqué que 90% des acides sialiques sont liés en α 2-3 sur le galactose externe et que les épitopes H1, H2, X, Y, Le^a et Le^b étaient exprimés (tableau 8, page 34). Malgré le nombre quasi-similaire de chaînes N-glycanniques présentes dans ces antigènes, cette étude a révélé les

différences importantes qui existent entre les N-glycannes du CEA et ceux du NCA-2 (proportions de glycannes N-Acétillactosaminiques, différence dans la quantité de N-Acétylglucosamine intercalaire, prédominance des chaînes externes de type 1 dans le NCA-2 ...). L'objet de cette étude comparative était basé sur l'obtention de données susceptibles de permettre la discrimination entre l'antigène CEA malin, considéré comme excellent marqueur de récidives du côlon en particulier, et sa contrepartie non maligne et ce dans un but diagnostique. Malheureusement, de récents résultats ont indiqué les faibles résultats à attendre pour les patients, puisque la survie des malades bénéficiant d'une surveillance par dosages du CEA ne serait prolongée que d'environ 7 jours (Kievit et Van De Velde, 1990).

tableau 8

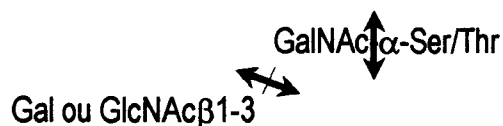
caractéristiques des chaînes glucidiques désialylées des antigènes NCA-2 et CEA

	NCA-2	CEA ^a
- nombre de chaînes/molécule	27	25
- type oligomannosidique (%)	0	8
- type complexe (%)	100	92
intercalaire	80	40
oligosaccharides avec chaînes de type 1 terminales	33	5
monoantenné	2	3
biantenné	14	28
triantenné	57	34
tétraantenné	27	27
-épitopes présents dans les chaînes extérieures (%)		
Gal β 1-4GlcNAc β 1-R (type 2)	45,0	43,8
Gal β 1-3GlcNAc β 1-R (type 1)	23,1	1,1
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-R (type H2)	11,5	2,2
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-R (type H1)	7,6	0,0
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R (X)	9,5	35,1
Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R (Y)	0,7	13,8
Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-R (Le ^a)	1,1	4,0
Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-R (Le ^b)	0,3	0
GalNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	1,2	0

(a) Yamashita et al (1985)

LES OLIGOSACCHARIDES LIBRES

En dehors des glycoprotéines et des glycolipides, le méconium contient une large variété d'oligosaccharides (tableau 7, pages 36-37). Les structures dérivant du catabolisme des O-glycannes suggèrent l'action d'endo-N-Acétyl- α -D-galactosaminidase, d'endo-N-Acétyl- β -D-glucosaminidase et d'endo- β -D-galactosidase.



Quant aux oligosaccharides produits du catabolisme des N-glycannes, ils semblent indiquer l'action d'une endo-N-Acétyl- β -D-glucosaminidase (Herlant-Peers et al, 1981).

tableau 7

oligosaccharides libres isolés du méconium

structures	remarques
☛ dérivées des O-glycannes	
Gal β 1-3GlcNAc	
Gal β 1-3GalNAc	
Gal β 1-4GlcNAc	épitope Lewis^x (type 2)
Fuc α 1-3	
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal	
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal	
☛ dérivées des N-glycannes	
Gal β 1-4	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6 \\ \left(\quad \quad \quad \right) \\ \text{GlcNAc}\beta 1-4\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\ \left(\quad \quad \quad \right) \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3 \end{array}$

tableau 7 (suite)

	Man α -1-6	
	\ Man β -1-4GlcNAc	
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-3	/ Man β -1-4GlcNAc) en mélange (A1))
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-6	\ Man β -1-4GlcNAc	
	Man α -1-3	
	GlcNAc β -1-2Man α -1-6	
	\ Man β -1-4GlcNAc	
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-3	/ Man β -1-4GlcNAc) en mélange (A2) ratio 2/1)
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-6	\ Man β -1-4GlcNAc	
	GlcNAc β -1-2Man α -1-3	
	Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-6	
	\ Man β -1-4GlcNAc	
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-3	/ Man β -1-4GlcNAc) en mélange (A3))
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-6	\ Man β -1-4GlcNAc	
	Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-3	
	NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-6	
	\ Man β -1-4GlcNAc	(A4)
NeuAc α -2-6Gal β -1-4GlcNAc β -1-2Man α -1-3	/ Man β -1-4GlcNAc	
☛ autres		
Gal β -1-4Glc		épitope Lewis^X (type6)
/ Fuc α -1-3		
Fuc α -1-2Gal β -1-4Glc		épitope Lewis^Y (type6)
/ Fuc α -1-3		

(d'après Herlant-Peers et al, 1981)

LES GLYCOLIPIDES

Sans aucune équivoque, les glycolipides représentent la classe de glycoconjugués la plus étudiée du méconium. Suspecté d'être une source d'antigènes groupaux (Côté,1970), celui-ci s'est effectivement révélé très riche en fucolipides puisque leur taux y est deux fois plus élevé que dans l'intestin adulte, et 50 à 100 fois plus élevé que dans une unité de sang (Karlsson et Larson,1978).

Sur ce constat ont été entreprises de nombreuses études menées par le groupe de Karl-Anders Karlsson ayant permis la description de tous les glycolipides neutres isolés à ce-jour du méconium (tableau 9, pages 39-40). Bon nombre des ces structures sont apparentées aux antigènes de groupes sanguins et à leurs précurseurs, ceci selon le statut groupal des sujets étudiés. Présents également des antigènes tels le **globotriaosylcéramide** (Karlsson et Larson,1981), le **paragloboside** immunodéTECTÉ par Myoga et al. (1988) ou encore les **Lewis^X-nLc₆** et **Lewis^Y-nLc₆** (Karlsson et Larson,1981) dont la relation avec la tumorigénèse est bien connue, et qui seront décrits dans le prochain chapitre consacré aux antigènes associés aux tumeurs (pages 65, 55, 56 à 59 respectivement). En outre, beaucoup de ces structures sont basées sur la série lacto et sont souvent incrémentées d'une unité N-Acétillactosaminique de type 2 comme c'est le cas pour le dimère **Le^Y/Le^a** (tableau 9, page 40) dont la nature d'antigène associé aux tumeurs n'a pu encore être déterminée jusqu'à présent par manque d'anticorps monoclonal disponible. Ces structures hybrides type2/type1 ou type1/type2 semblent effectivement étroitement associées à la cancérisation.

S'agissant des gangliosides (tableau 9, pages 40-41), leur concentration méconiale est 100 fois plus élevée que dans la muqueuse intestinale adulte (Svennerholm et al,1982), mais reste néanmoins très inférieure à celle des glycolipides neutres. Comme pour la muqueuse intestinale adulte, le **GM₃** est le ganglioside majeur (80% des gangliosides totaux) mais il semble faire exception puisque tous les autres gangliosides de la série ganglio sont en très faible quantité par rapport à la muqueuse adulte (Svennerholm et al,1982). Après le **GM₃**, l'**α-2-6 sialylparagloboside (2-6 SPG)** représente le ganglioside pondéralement majeur du méconium (Nilsson et al,1981). Facilement isolé en grande quantité, celui-ci a permis la conception des anticorps monoclonaux **LM-4** (Nilsson et al,1984) et **MSG-15** (Taki et al,1990) dirigés contre les épitopes **NeuAcα-2-6Gal** fortement liés à la cancérisation. Les autres gangliosides méconiaux de la série néolacto exprimant cet épitope sont sous forme branchée rarissime (Taki et al,1992a). La nature oncofoetale de ce type de structures sialylées sera largement

discutée dans le prochain chapitre (pages 55-56). D'autres antigènes relatifs aux tumeurs ont été détectés tels le sialyl-Lewis^a (Magnani et al,1982) ou le sialyl-Lewis^x (Blaszczyk et al,1984). Enfin, des antigènes hétérophiles de type Hanganutziu-Deicher seraient présents dans le méconium (Hirabayashi et al,1987), le HD-5: NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer et le HD-7: NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, détectés par un anticorps anti-HD3 réagissant contre le domaine immunodominant de ces molécules qu'est l'acide N-Glycolylneuraminique. Ces antigènes sont absents des tissus humains normaux, mais peuvent être exprimés dans des tumeurs variées (Higashi et al,1984). Il est cependant encore difficile de prédire la signification clinique de ces antigènes dans les cancers humains, ceux-ci étant présents en quantités infinitésimales.

tableau 9

glycolipides isolés ou détectés dans le méconium

STRUCTURES DES GLYCOLIPIDES NEUTRES	désignation IUPAC-IUB (a)	références et remarques
☛ glucosyl- et lactosylcéramide		
Glc β 1-Cer	GlcCer	Karlsson et Larson (1981)
Gal β 1-4Glc β 1-Cer	LacCer	"
☛ série gala		
Gal β 1-Cer	GalCer	"
Gal α 1-4Gal β 1-Cer	Ga ₂ Cer	"
☛ série globo		
Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₃ Cer	antigène P^k
GlcNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	III ³ GlcNAc β -Gb ₃ Cer	Larson (1986)
GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₄ Cer	Karlsson et Larson (1981) antigène P (globoside)
☛ série lacto		
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Lc ₄ Cer	Karlsson et Larson (1979)
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ (Gal β 1-4GlcNAc β)-Lc ₄ Cer	Karlsson et Larson (1981)
[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3] ₂ Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ (Gal β 1-4GlcNAc β) ₂ -Lc ₄ Cer	"
☛ série néolacto		
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	nLc ₄ Cer	Myoga et al (1988) paragloboside

STRUCTURES DES FUCOLIPIDES

désignation IUPAC-IUB (a)

références et remarques

☛ série globo

Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-CerIV³(Fuc α 1-2Gal β)-Gb₄CerKarlsson et Larson
(1981)**globo-H**

☛ série lacto

Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIV²Fuc α -Lc₄Cer**épitope H-5-1**Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIII⁴Fuc α -Lc₄Cer**épitope Lewis^a (Le^a-5)**Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIV²Fuc α , IV³Gal α -Lc₄CerAngström et al (1982)
épitope B-6-1Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIV³(Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β)-Lc₄CerKarlsson et Larson
(1981)**épitope H sur type 2**Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-Glc β 1-CerIV³(Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β)-Lc₄Cer**épitope Lewis^x étendu**Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIII⁴Fuc α , IV²Fuc α -Lc₄Cer**épitope Lewis^b (Le^b-6)**Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-Gal β 1-4Glc β 1-CerIV³(Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β)-Lc₄Cer**épitope Lewis^y étendu**Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIII⁴Fuc α , IV²Fuc α , IV³Gal α -Lc₄CerAngström et al (1982)
épitope BLe^b (B-7-1)Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-CerIII⁴Fuc α , IV³(Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β)-Lc₄CerKarlsson et Larson
(1981)**dimère Le^v/Le^a****STRUCTURES DES GANGLIOSIDES**

désignation IUPAC-IUB (a)

références et remarques

☛ série ganglio

NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-CerII³NeuAc α -LacCerNilsson et al (1981)
GM₃NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-CerII³(NeuAc α)₂-LacCer**GD₃**Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-CerII³NeuAc α -Gg₄Cer**GM_{1a}**NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-CerII³NeuAc α , IV³NeuAc α -Gg₄Cer**GD_{1a}**NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-CerII³(NeuAc α)₂, IV³NeuAc α -Gg₄Cer**GT_{1b}**

☛ série néolacto

NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ⁶ NeuAc α -nLc ₄ Cer	2-6 SPG
NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	III ³ Fuc α , IV ³ NeuAc α -nLc ₄ Cer	Blaszczyk et al (1984) antigène sialyl-lewis^x
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 		
NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ⁶ (Gal β 1-4GlcNAc β), IV ⁶ NeuAc α -nLc ₄ Cer	Taki et al (1992b)
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 		
NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ (NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β), IV ⁶ (Gal β 1-4GlcNAc β)-nLc ₄ Cer	

☛ série lacto

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ NeuAc α -Lc ₄ Cer	Prieto et Smith (1986) 2-3 Type 1
Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	III ⁶ NeuAc α -Lc ₄ Cer	Prieto et Smith (1985)
NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ NeuAc α -Lc ₄ Cer	Magnani et al (1982) antigène sialyl-lewis^a
GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer		Fredman et al (1989a) hybride lacto/ganglio

☛ antigènes de type Hanganutziu-Deicher

NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ NeuGc α -nLc ₄ Cer	Hirabayashi et al (1987) HD-5
NeuGc α 2-3(Gal β 1-4GlcNAc) ₂ β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ³ (NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β)-nLc ₄ Cer	HD-7

(a) désignation selon les recommandations de la Commission de Nomenclature Biochimique IUPAC-IUB (1977)

LES TAAs DU MECONIUM

Dans le tableau ci-après ont été rassemblés les principaux antigènes associés aux tumeurs isolés ou détectés dans le méconium et dont les mécanismes de formation et d'expression seront discutés dans le prochain chapitre.

tableau 11

les antigènes associés aux tumeurs, isolés ou détectés dans le méconium

structures	désignation
GalNAc- α -Ser/Thr	épitope Tn
Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr	épitope T
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R	épitope Lewis ^X
NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R	épitope sialyl-Lewis ^X
antigène NCA-2 apparenté à l'antigène carcino-embryonnaire (CEA)	
Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	antigène pk ou Gb ₃
Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	globo-H
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	paragloboside
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Lewis ^X -nLc ₆
Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Lewis ^Y -nLc ₆
NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	sialyl α 2-6 paragloboside
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6	
NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ⁶ (Gal β 1-4GlcNAc β), IV ⁶ NeuAc- α -nLc ₄ Cer
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	sialyl α 2-3 type 1
NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	sialyl-Lewis ^a
NeuGc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	HD-5
NeuGc α 2-3(Gal β 1-4GlcNAc) β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	HD-7

CHANGEMENTS MOLECULAIRES DES ANTIGENES GLUCIDIQUES ASSOCIES AU CANCER

En 1964, à Boston, Sen-itiroh Hakomori et Roger Jeanloz isolent pour la première fois des glycolipides contenant de grandes quantités de fucose, à partir d'adénocarcinomes humains. A l'époque, le fucose n'était reconnu que comme un constituant mineur des glycolipides de groupe sanguin A. Ce n'est qu'ultérieurement que ces glycolipides tumoraux furent identifiés comme étant les antigènes Lewis^a, Lewis^b et Lewis^x (Hakomori et Andrews, 1970; Yang et Hakomori, 1971). Mais ce sera l'avènement technologique des anticorps monoclonaux (Köhler et Milstein, 1975) qui va confirmer la relation existant entre la glycosylation aberrante et la transformation oncogénique. En effet, les anticorps monoclonaux développés à partir de cellules tumorales se montrent dirigés contre des antigènes glucidiques. De même, les anticorps dirigés contre des glycanes purifiés à partir de cellules tumorales, et utilisés dans le but de «screener» un large éventail de tissus cancéreux, ont permis la classification des antigènes associés aux tumeurs selon leur distribution et leur spécificité (tableau 10 ci-dessous).

tableau 10

classification, selon leur spécificité d'expression, des antigènes glucidiques associés aux tumeurs

1/ structures nouvelles fortement exprimées dans les cellules tumorales, absentes de leurs cellules ancestrales mais exprimées dans un nombre limité d'autres cellules tumorales.

(ex: GD3 dans les mélanomes; polymères Lewis^x, sialyl Lewis^a et sialyl Lewis^x dans les cancers gastrointestinaux)

2/ structures communes fortement exprimées dans les cellules tumorales, mais présentes en petite quantité dans des types variés de cellules normales. Les anticorps peuvent reconnaître cette forte densité ou une conformation induite par cette forte densité. C'est l'anticorps dirigé contre la structure et non la structure qui définit la spécificité tumorale.

(ex: GM3 dans les mélanomes; Lewis^x dans les cancers gastrointestinaux)

3/ structures exclusivement exprimées dans les cellules tumorales, mais absentes ou présentes en des taux immunologiquement indétectables dans les cellules normales.

(ex: antigènes A incompatibles, Tn et sialylTn dans des cancers variés)

La majorité des antigènes glucidiques associés aux tumeurs appartient aux deux premières catégories. Une telle classification est faite par commodité, car chaque tumeur peut exprimer différentes classes d'antigènes, selon des mécanismes encore non élucidés, expliquant pourquoi l'utilisation d'anticorps combinés est souvent nécessaire pour le diagnostic et les applications thérapeutiques.

Après avoir classifié ces antigènes associés aux tumeurs, deux questions fondamentales se posent:

- ☛ par quels mécanismes sont-ils formés ?
- ☛ sous quelles formes s'expriment ces épitopes ?

A la première question, nous pouvons répondre que ces antigènes associés aux tumeurs sont le résultat de plusieurs mécanismes basiques qui sont (tableau 11 ci-après): la synthèse incomplète, la néosynthèse et les changements d'organisation membranaire.

tableau 11

mécanismes conduisant à la formation des antigènes associés aux tumeurs

A / Synthèse incomplète avec accumulation de structures précurseurs

gangliosides GM₂, GD₂, GD₃ dans les mélanomes et neuroblastomes

globoside Gb₃ dans le lymphome de Burkitt

antigènes glycoprotéiques T et Tn dans divers cancers

B / Néosynthèse

polymères des séries lacto: di- ou tri-Lewis^X, trifucosyl Lewis^Y ainsi que les sialyl-Lewis^a et sialyl-Lewis^X dans différents adénocarcinomes

glycolipides à épitope: NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc dans les adénocarcinomes du foie et du côlon

sialyl Tn dans divers adénocarcinomes

C / Changements dans l'organisation membranaire des antigènes glucidiques

- présents dans tous les types de tumeurs

- forte exposition des antigènes causée par une perte de crypticité influencée par:

→ les glycoconjugués et protéines adjacents aux antigènes glycolipidiques

→ la densité des glycolipides

→ la composition de la céramide

Les antigènes tumoraux résultant d'une **synthèse incomplète** sont des structures relativement nouvelles pour des tissus normaux, représentant des précurseurs de glycanes plus complexes et sont fortement accumulés en raison d'une synthèse accrue de ces précurseurs ou d'un blocage dans la synthèse des glycanes plus complexes (tableau 11A, page 44);

beaucoup d'antigènes, particulièrement ceux des séries lacto, possèdent des structures nouvelles qui sont les fruits d'une **néosynthèse** causée par l'activation de glycosyltransférases normalement «silencieuses» (tableau 11B, page 44);

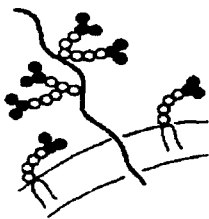
des **changements d'organisation des antigènes glucidiques membranaires** (tableau 11C, page 44) observés dans les cellules tumorales, sont causés par un démasquage induit par la délétion de glycoconjugués et protéines adjacents par des sialidases ou protéases (Urdal et Hakomori,1983). De même, certains antigènes glycolipidiques communs (GM₃, Gb₃ ou Lewis^x par exemple) présents en densité élevée dans les cellules tumorales sont reconnus par des anticorps ne réagissant pas contre les tissus normaux qui expriment moins fortement ces antigènes (Hakomori et al,1981; Nores et al,1987). Enfin, la composition de la céramide (longueur de la chaîne d'acide gras et la présence ou absence de groupements α -hydroxylés) influence fortement l'exposition des chaînes glucidiques donc leur antigénicité (Yoshino et al,1982; Nudelman et al,1982).

A la deuxième question, la réponse est fournie par la figure 12 (page 46):

- une première classe d'antigènes (dits de classe 1) est caractérisée par des chaînes glucidiques de type 1 et 2 des séries lacto portées à la fois par des glycolipides et des glycoprotéines;
- les antigènes de classe 2 ne sont exprimés que sous forme glycolipidique et consistent essentiellement en les séries ganglio et globo;
- la troisième classe d'antigènes est associée aux glycoprotéines, en particulier de type mucine.

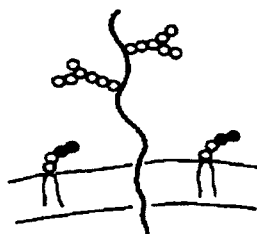
C'est dans cet ordre que nous allons maintenant aborder plus en détail les différences structurales existant entre les glycoconjugués tumoraux et normaux, et que nous illustrerons notre propos par quelques exemples d'applications thérapeutiques impliquant ces antigènes.

1 / épitopes exprimés à la fois sur les glycolipides et les glycoprotéines



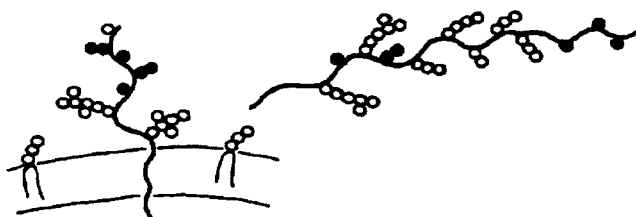
☛ structures des séries lacto type 1 et type 2

2 / épitopes exclusivement exprimés sur les glycolipides



☛ structures des séries ganglio et globo

3 / épitopes exclusivement exprimés sur les glycoprotéines



☛ T, Tn, sialyl Tn

figure 12

principaux modes d'expression des antigènes glucidiques associés aux tumeurs

(d'après Hakomori, 1992)



CARACTERISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGENES PORTES PAR LES CHAINES DE TYPE 1 ET 2

Chaînes Lacto de type 1

1. Voies normales de synthèse (figure 13, page 48)

Le disaccharide Gal β 1-3GlcNAc représente le support des déterminants de groupe sanguin ABH et des antigènes Lewis^a, Lewis^b, A.Lewis^b et B.Lewis^b (Watkins,1980). Les chaînes de type 1 prédominent sur celles de type 2 dans les tissus épithéliaux gastrointestinaux adultes et sont largement fucosylées. A l'état non substitué, ce disaccharide - alors appelé Lewis^C - y est rarement rencontré (Graham et al,1977). Quant à la sialylation de ces chaînes dans les tissus normaux, elle est très limitée par rapport à la fucosylation.

2. Voies oncofoetales (figure 13, page 48 et tableau 13, page 52)

Dans les tumeurs, les chaînes de type 1 peuvent subir les modifications suivantes:

- ☛ **sialylation accrue**, aussi bien sur le résidu galactosyl terminal que sur la N-Acétyleglucosamine pénultième, conduisant aux chaînes monosialyl α 2-3 et disialyl α 2-3, α 2-6 respectivement définies par les anticorps monoclonaux C-50 (Nilsson et al,1985b) et FH9 (Fukushi et al,1986).
- ☛ **α 1-4 fucosylation** de la chaîne α 2-3 monosialylée conduisant à l'antigène sialyl Lewis^a reconnu par l'anticorps 1116 NS 19-9 (Koprowski et al,1979). L'ordre des réactions enzymatiques nécessaires pour la synthèse du sialyl Lewis^a est une α 2-3 sialylation suivie d'une α 1-4 fucosylation. L'ordre inverse ne se produit jamais (Hansson et Zopf,1985).

Les épitopes glycaniques portés par des chaînes de type 1 comme ceux portés par les chaînes de type 2 (voir paragraphe suivant, pages 52-62) peuvent s'exprimer à la fois sur des glycolipides et des glycoprotéines (antigènes dits de classe I: figure 12, page 46). Cependant, comme il est techniquement moins difficile d'isoler un glycolipide qu'une glycoprotéine, il arrive très souvent que la structure chimique de l'épitope soit établie sur la base d'un glycolipide. Néanmoins, la quantité totale d'antigène associé à une glycoprotéine doit être plus élevée puisque les antigènes relargués dans la circulation sont principalement des glycoprotéines, en particulier de type mucine (Hakomori,1989).

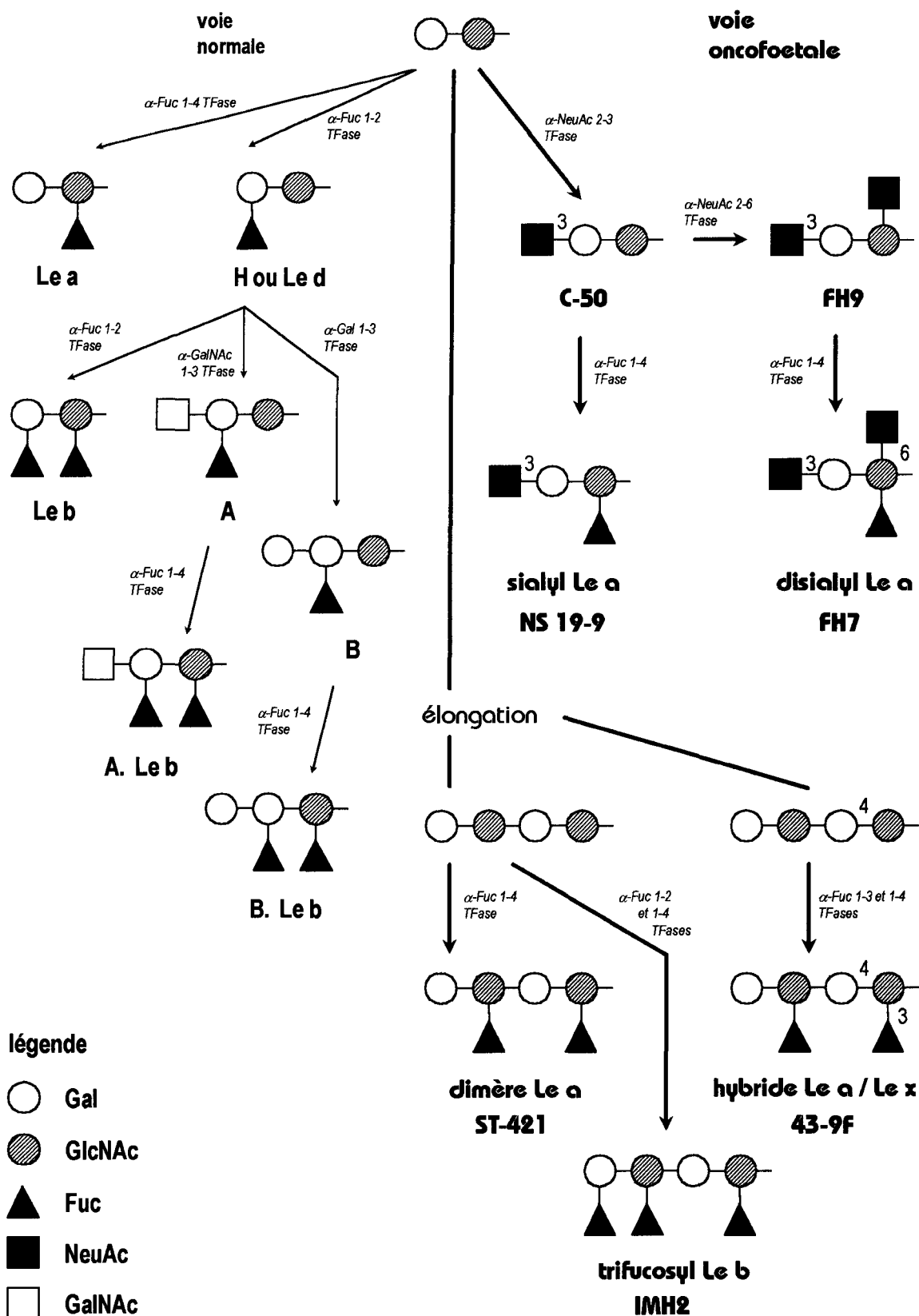


figure 13

voies de biosynthèse normale et oncofoetale des chaînes glucidiques de la série Lacto-type 1



C'est ainsi que l'antigène sialyl Lewis^a a été isolé sous forme gangliosidique dans les cancers pancréatiques, gastriques et du côlon (Magnani et al,1982) puis sous forme glycoprotéique dans l'adénocarcinome colorectal (Kitagawa et al,1991). Associé à une glycoprotéine (Magnani et al,1983; Del Villano et al,1983), sa présence dans le sérum de patients cancéreux à des taux élevés a conduit à son utilisation clinique dans le diagnostic de diverses tumeurs du tractus digestif (Herlyn et al,1982). Cependant, certaines pathologies hépatiques et pancréatiques bénignes génèrent aussi un taux de CA 19-9 sérique élevé, induisant de faux résultats positifs (Kannagi et al,1988) et limitant donc sa valeur diagnostique. L'association du sialyl Lewis^a avec le processus métastatique sera étudiée dans le prochain paragraphe consacré aux chaînes de type 2.

Le disialyl Lewis^a (IV³NeuAcα,III⁶NeuAcα,III⁴Fuca-Lc₄Cer) a été isolé dans l'adénocarcinome du côlon (Nudelman et al,1986). Bien qu'étant un composé mineur de cette tumeur, sa forte immunogénicité a conduit à l'établissement de l'anticorps monoclonal FH7 (Nudelman et al,1986a) dirigé non seulement contre le disialyl Lewis^a mais aussi contre son produit de dégradation issu d'un traitement par la sialidase: l'α2-6 sialyl Lewis^a (tableau 12 ci-dessous).

tableau 12

réactivité des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène Lewis^a et ses dérivés sialylés

antigène	structure	CA3-F4 (a) anti-Le ^a	NS 19-9	FH7
Lewis ^a	Galβ1-3GlcNAcβ1-R / Fuca1-4	+++	-	-
2,3 sialyl Lewis ^a	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-R / Fuca1-4 NeuAcα2-6	-	+++	-
Disialyl Lewis ^a	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-R / Fuca1-4 NeuAcα2-6	-	-	+++
2,6 sialyl Lewis ^a	Galβ1-3GlcNAcβ1-R / Fuca1-4	++	-	++

(a) Young et al (1983)

Des études immunohistochimiques comparatives utilisant les anticorps NS 19-9 et FH7, menées sur des tissus gastrointestinaux et pancréatiques et concernant l'expression des antigènes 2-3 sialyl Lewis^a et disialyl Lewis^a respectivement, ont montré:

- que le 2-3 sialyl Lewis^a était peu ou pas exprimé dans les cellules normales contrairement au disialyl Lewis^a;

- que cette proportion était quasi inverse dans les cellules tumorales (Itzkowitz et al,1988; Itai et al,1988 et 1991).

Ainsi dans les tissus normaux, le rapport 2-3 sialyl/disialyl y indique la présence 3 à 4 fois plus élevée de disialyl Lewis^a. Dans les tumeurs, ce rapport est largement supérieur à 10, reflétant l'accumulation du 2-3 sialyl Lewis^a. Par conséquent, la détermination de ce rapport permettrait une meilleure discrimination entre les pathologies non bénignes et cancéreuses de la sphère digestive (Itai et al,1991).

Récemment, des essais thérapeutiques utilisant une immunotoxine formée par le couplage entre l'anticorps murin KM213 anti-sialyl Lewis^a et la chaîne A de la ricine ont montré *in vitro* et *in vivo* une forte cytotoxicité envers les cellules tumorales exprimant le sialyl Lewis^a (Shitara et al,1991).

La forme afucosylée de l'antigène 2-3 sialyl Lewis^a, reconnue par l'anticorps C-50 (figure 13, page 48), a été isolée dans les adénocarcinomes pancréatiques et gastrointestinaux (Månsson et al,1985), les cancers pulmonaires à petites cellules (Nilsson et al,1985b) et les gliomes (Fredman et al,1988). Par ailleurs, des taux sériques élevés de cet antigène ont été détectés chez des patients atteints de cancers très variés (Holmgren et al,1984). Ainsi ce marqueur est peu spécifique d'une localisation tumorale, mais est toutefois particulièrement utile chez les sujets Lewis négatif qui n'expriment pas le CA 19-9 (Brockhaus et al,1985; Tempero et al,1987).

En fait les marqueurs CA 19-9 et C-50 sont "limités" pour le dépistage d'un cancer, c'est à dire pour sa mise en évidence chez un sujet en l'absence de tout signe clinique, et ceux-ci ont pour principal intérêt la surveillance des malades. La détermination du taux d'un marqueur avant, au-cours et après un traitement pouvant avoir un intérêt pronostique sur l'évolution de la maladie.

▀ élancement des chaînes de type 1:

L'extension des structures de type lacto a toujours été considérée comme limitée aux chaînes de type 2, exception faite des embryoglycannes de tératocarcinomes possédant des chaînes allongées de type 1

mais terminées par des unités branchées de type 2 (Fukuda et al,1985). La présence de chaînes étendues constituées exclusivement d'unités de type 1 dans certaines tumeurs représente une nouvelle classe d'épitopes associés aux tumeurs.

Ainsi le dimère Lewis^a, Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-Cer, a été isolé d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon (Stroud et al,1991) et montre une réactivité préférentielle avec l'anticorps monoclonal NCC-ST-421 (Watanabe et al,1985). Des études menées sur différentes lignées cellulaires de carcinomes coliques et pulmonaires en particulier, ont indiqué que l'anticorps NCC-ST-421 exerce un effet anti-tumoral significatif *in vitro* et *in vivo* n'affectant pas l'antigène Lewis^a exprimé dans les tissus normaux (Watanabe et al,1991). En conséquence, cet anticorps possède un potentiel thérapeutique certain sur les tumeurs qui expriment le dimère Lewis^a.

L'antigène trifucosyl Lewis^b ou dimère Le^b/Le^a: Fuca1-2Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-Cer, a été isolé de la même lignée cellulaire Colo 205 d'adénocarcinome du côlon que le dimère Lewis^a (Stroud et al,1992). L'anticorps murin IMH2 préparé par immunisation avec l'antigène trifucosyl Lewis^b purifié, bien que présentant une forte réaction croisée avec le déterminant Le^y/Le^x, montre une forte réactivité avec les tumeurs du côlon, du pancréas et du foie sans toutefois réagir avec la muqueuse colique normale et en présentant une réactivité minimale avec les foie et pancréas normaux (Ito et al,1992). Ces résultats indiquent que le dimère Le^b/Le^a est un marqueur de cancérisation, et que l'anticorps IMH2 possède vraisemblablement une potentialité diagnostique et thérapeutique.

Enfin, l'antigène Le^a/X est un isomère du dimère Lewis^a décrit précédemment: Galβ1-3[Fuca1-4]GlcNAcβ1-3Galβ1-4[Fuca1-3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-Cer. Ce n'est pas à proprement parler une structure étendue de type 1, mais un hybride où l'épitope Lewis^a est exprimé sur une chaîne de type 2. Cet antigène n'a, à ce jour, été isolé que de cancers épidermoïdes pulmonaires (Mårtensson et al,1988). L'anticorps monoclonal 43-9F, établi à partir d'une lignée cellulaire de ce type de tumeur, présente une très forte affinité pour ce déterminant Le^a/X accompagnée d'une faible réaction croisée avec l'antigène Lewis^a (Pettijohn et al,1987). Bien que composé mineur, cet antigène constituerait donc un marqueur du cancer épidermoïde du poumon, puisqu'il est fréquemment détecté dans le sérum des malades atteints de cette tumeur et occasionnellement dans le poumon normal (Pettijohn et al,1987). Par ailleurs, un travail

récent a montré que les patients Le^a/X positif survivent plus longtemps que ceux dont les tumeurs sont antigène négatif (Battifora et al, 1992).

tableau 13

antigènes associés aux tumeurs portés les chaînes de type 1

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
C-50 (Nilsson et al, 1985b)	sialyl 2-3 type 1	- adénocarcinomes gastrointestinaux et pancréatiques (Månsson et al, 1985) - cancer du poumon à petites cellules (Nilsson et al, 1985b) - gliome (Fredman et al, 1988)
FH9 (Fukushi et al, 1986)	disialyl type 1	- adénocarcinome du côlon (Fukushi et al, 1986) - gliome (Wikstrand et al, 1991)
1116 NS 19-9 (Koprowski et al, 1979)	2-3 sialyl Lewis ^a	- adénocarcinomes gastrointestinaux et pancréatiques (Magnani et al, 1982)
FH7 (Nudelman et al, 1986a)	disialyl Lewis ^a	- adénocarcinome du côlon (Nudelman et al, 1986a)
43-9F (Pettijohn et al, 1987)	antigène Le ^a /X	- cancer épidermoïde du poumon (Mårtensson et al, 1988)
NCC-ST-421 (Watanabe et al, 1985)	di Lewis ^a	- adénocarcinome du côlon (Stroud et al, 1991)
IMH2 (Ito et al, 1992)	trifucosyl Lewis ^b	- adénocarcinome du côlon (Stroud et al, 1992) - tumeurs du foie, pancréas et côlon (Ito et al, 1992)

Chaînes Lacto de type 2

1. Voies normales de synthèse (figure 14, page 53)

La chaîne de type 2: Gal β 1-4GlcNAc est le support majeur des déterminants ABH des érythrocytes humains, mais est également trouvée en petites quantités dans les cellules épithéliales. Dans les tissus et hématies adultes normaux, la chaîne de type 2 peut présenter les variations suivantes:

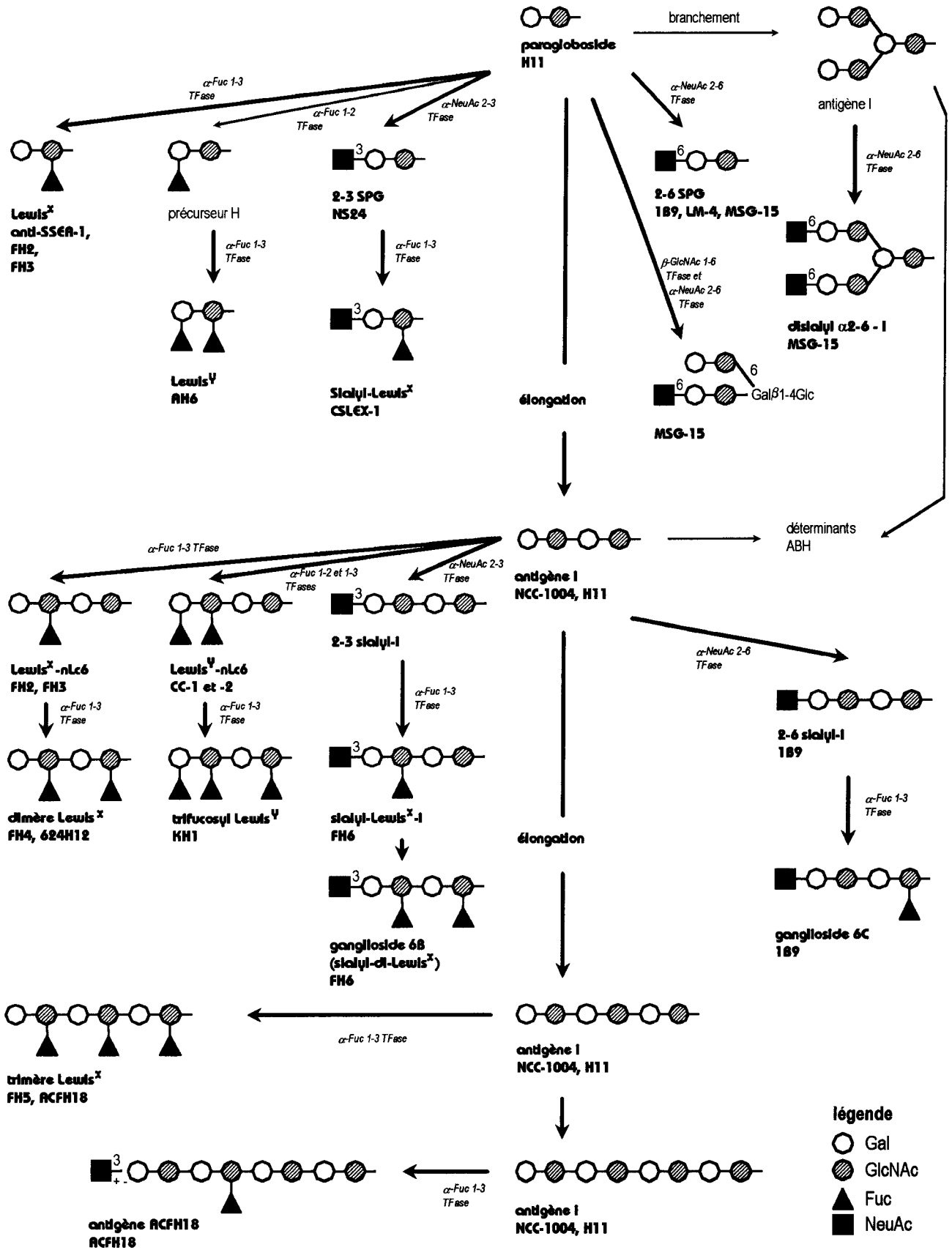


figure 14

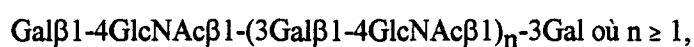
voies de biosynthèses normale et oncofoetale des chaînes glucidiques de type 2

- ☛ **élongation** de la chaîne par répétition de la séquence Gal β 1-4GlcNAc, avec branchement, via l'action de la β 6-N-Acétyleglucosaminyltransférase pour former l'antigène I. Dans les érythrocytes et tissus adultes, cette structure est prépondérante par rapport à la structure linéaire i majeure au stade foetal (Watanabe et Hakomori, 1976a);
- ☛ **fucosylation** du galactose terminal pour donner une structure H pouvant être ultérieurement convertie en antigènes A et B. Reflétant la proportion des chaînes de type 2, les structures branchées prédominent sur les linéaires;
- ☛ comparée aux chaînes de type 1, la sialylation de la chaîne de type 2 est plus importante, et toute une série de structures sialylées en terminaison sont produites dans des cellules et tissus normaux variés (pour revue: Stults et al, 1989);
- ☛ la chaîne de type 2 α 2-3 sialylée est rarement fucosylée sur le résidu GlcNAc pénultième dans les types cellulaires normaux, exception faite notablement de certaines lignées leucocytaires (Fukuda et al, 1984b);
- ☛ quant à la présence des structures Lewis^X et Lewis^Y dans divers types cellulaires normaux, celle-ci a été souvent rapportée. Néanmoins, les quantités d'antigènes Lewis^X et Lewis^Y exprimés dans les tissus épithéliaux normaux, en particulier, sont beaucoup plus faibles que dans diverses tumeurs dérivées de ces tissus comme nous le verrons dans le prochain paragraphe.

2. Voies oncofoetales (figure 14, page 53)

Les altérations des chaînes de type 2 sont les plus fréquemment rencontrées dans les cancers. Les principaux changements ci-après ont été rapportés:

- ☛ prédominance de chaînes allongées linéaires (antigène i) avec sialylation possible en α 2-3 (figure 14, page 53 et tableau 14, page 57). L' anticorps monoclonal humain NCC-1004, généré à partir de cellules tumorales pulmonaires et dirigé contre la structure i:



réagit fortement avec une grande majorité de cancers pulmonaires épidermoïdes, de l'oesophage et de la glande thyroïde (Hirohashi et al, 1986). Le processus d'élongation permettant la formation de ces chaînes linéaires a été bien étudié (Holmes et al, 1987b) et nous y ferons référence ultérieurement.

Un précurseur de ces structures i, le lactonéotétraosylcéramide ou **paragloboside** trouvé en faible quantité dans les érythrocytes (Siddiqui et Hakomori, 1973), a été mis en évidence dans certaines lignées cellulaires tumorales (Taki et al, 1985) et un taux élevé de cet antigène est détecté dans le sérum des patients atteints de cancers hépatiques et pancréatiques (Myoga et al, 1988). Par ailleurs, l'activité β 4-galactosyltransférase catalysant la formation du lactonéotétraosylcéramide à partir du Lc_3Cer est accrue dans le sérum de patients cancéreux, et son dosage pourrait aider à la détection ou au suivi des patients après thérapie (Nishiwaki et al, 1992).

La structure α 2-3 sialylée du paragloboside, le 2-3 SPG: NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer bien que souvent exprimée dans divers types cellulaires normaux, est fortement réactive avec l'anticorps NS-24 et ce dans les tumeurs d'origine gastrique (Suzuki et al, 1991).

☛ **α 2-6 sialylation** dans les glycolipides (figure 14, page 53) conduit à la formation de la séquence terminale NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc reconnue par de nombreux anticorps monoclonaux (tableau 14, page 57). L' α 2-6 sialylparagloboside ou 2-6 SPG, NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, accumulé dans les adénocarcinomes du foie et du côlon (Hakomori et al, 1983a; Taki et al, 1990) et détecté dans les tumeurs pulmonaires par l'anticorps LM-4 (Nilsson et al, 1985a), fut le premier glycolipide de ce type caractérisé dans les tumeurs. Jusqu'alors, celui-ci était connu comme étant un composé mineur des érythrocytes (<1% des gangliosides totaux) et d'autres types cellulaires (Watanabe et al, 1979), alors qu'il représente pondéralement le second ganglioside du méconium (Nilsson et al, 1981). En fait, le 2-6 SPG appartient à une famille glycolipidique exprimant le rare épitope NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, alors que celui-ci est largement distribué au sein des glycoprotéines (pour références: Montreuil, 1982). Ceci suggère donc que les sialyltransférases responsables de la formation des épitopes NeuAc α 2-6Gal glycoprotéiques et glycolipidiques sont différentes (Taki et al, 1992b). De plus, l'accumulation de ces gangliosides dans les tumeurs (pouvant représenter jusqu'à 30% de la fraction monosialogangliosidique de l'hépatome pour le 2-6 SPG; Taki et al, 1990) ainsi que dans le méconium, pourrait être interprétée comme le résultat de l'activation d'une NeuAc α 2-6Gal transférase «foetale» normalement silencieuse dans les tissus adultes (Nilsson et al, 1985a).

Un autre glycolipide linéaire, le **ganglioside 6C**: NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, accumulé dans les adénocarcinomes du foie et du côlon, est caractérisé par la présence d'un unique résidu de fucose sur la GlcNAc interne (III) du core

lactonéohexaosylcéramide (Hakomori et al,1983a). L' α 2-6 sialylation du galactose terminal inhiberait-elle ainsi la fucosylation de la GlcNAc pénultième ?

En réponse à cette question, Holmes et al (1986) ont montré que l' α 1-3 fucosyltransférase isolée de la lignée cellulaire pulmonaire PC9 pouvait synthétiser la formation des dérivés mono- et difucosylés quand VI³NeuAcnLc₆ était accepteur, alors que seul un dérivé monofucosylé sur la GlcNAc interne était obtenu à partir de VI⁶NeuAcnLc₆. Ceci est probablement dû aux propriétés stériques différentes du dérivé α 2-6 sialylé, n'autorisant que l'incorporation d'un seul fucose sur le résidu GlcNAc (III) pour former le ganglioside 6C.

Plus récemment encore, des **gangliosides branchés** (figure 14, page 53 et tableau 14, page 57) porteurs de l'épitope NeuAc α 2-6Gal ont été isolés d'hépatomes (Taki et al,1992b). Le premier est un disialoganglioside de type I, totalement nouveau à ce jour . Seule une structure monosialylée sur la branche inférieure a été décrite dans le méconium (Taki et al,1992a). Le second est un monosialoganglioside de type I également, mais particulier puisque la branche est fixée sur le résidu Gal du core lactosyl interne. Exceptés le lait où beaucoup d'oligosaccharides ont une unité N-Acétyllactosaminique branchée sur le résidu de galactose attaché au glucose (Tarrago et al,1988), et le méconium (Taki et al,1992a); c'est la première mise en évidence d'un ganglioside de ce genre. Ces antigènes portés par des structures I sont vraiment rarissimes et leur découverte suggère que la β 6-N-Acétyleglucosaminyltransférase responsable du branchement est activée dans les tissus embryonnaires, en particulier intestinaux, et dans les tissus hépatiques cancéreux (Taki et al,1992a).

☛ Toute une série de chaînes de type 2 non branchées sont α 1-3 fucosylées sur la GlcNAc pénultième, puis sur les GlcNAc internes, conduisant aux **polymères Lewis^X** (figure 14, page 53).

Les antigènes Lewis^X (Yang et Hakomori,1971), di- et tri-Lewis^X (Hakomori et al,1984) sont trouvés accumulés dans de nombreux cancers humains et de nombreux anticorps ont été générés contre ces structures (tableaux 15 et 16, page 58). Le premier d'entre eux fut élaboré par immunisation à partir de cellules de tératocarcinome F9, et définissait à l'époque un antigène inconnu fortement exprimé au stade morula qui fut appelé «Stage-Specific Embryonic Antigen-1» ou SSEA-1 (Solter et Knowles,1978). Ce n'est qu'en 1981 que la nature chimique de l'épitope reconnu par l'anti-SSEA-1 fut élucidée: Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc ou Lewis^X (Gooi et al,1981).

tableau 14

antigènes associés aux tumeurs portés les chaînes de type 2

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
H-11 (Myoga et al, 1988)	paragloboside	- lignées cellulaires du poumon, de l'estomac et du côlon (Taki et al, 1985) - tumeurs hépatiques et pancréatiques (Myoga et al, 1988)
NCC-1004 (Hirohashi et al, 1986)	antigène i	- tumeurs pulmonaires épidermoïdes, oesophage et glande thyroïde (Hirohashi et al, 1986)
NS-24 (Suzuki et al, 1991)	2-3 SPG	- adénocarcinomes gastriques (Suzuki et al, 1991)
1B9 (Hakomori et al, 1983 a et c)	2-6 SPG	- adénocarcinomes du foie et du côlon (Hakomori et al, 1983a; Taki et al, 1990)
LM-4 (Nilsson et al, 1985a)		- cancers du poumon (Nilsson et al, 1985a)
MSG-15 (Taki et al, 1990)	ganglioside 6C	- adénocarcinomes du foie et du côlon (Hakomori et al, 1983a)
reconnaissent tous la séquence NeuAc α 2-6Gal β	disialyl α 2-6 type I	- hépatomes (Taki et al, 1992b)
	monosialyl α 2-6 type I	- hépatomes (Taki et al, 1992b)

Les anticorps FH4, FH5, 624H12 (tableaux 15 et 16, page 58) réagissent plus spécifiquement avec les structures polymérisées di- ou tri-Lewis^X, fruits d'une néosynthèse et qui sont accumulées dans les adénocarcinomes du foie et du côlon en particulier (Hakomori et al, 1982 et 1984). Récemment, l'anticorps monoclonal 624H12 anti-haptène di-Lewis^X a été utilisé pour la détection précoce du cancer du poumon, ce qui n'a pas été possible avec d'autres techniques diagnostiques conventionnelles (Kyogashima et al, 1989). La présence d'un nouvel antigène associé aux tumeurs gastrointestinales, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, et réagissant fortement avec l'anticorps monoclonal ACFH-18, indique qu'une nouvelle route biosynthétique jusqu'alors inconnue peut exister: l'élongation de la chaîne de type 2 avec fucosylation unique au milieu de cette chaîne sialylée ou non (Nudelman et al, 1988).

tableau 15

réactivité des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes X

antigène	anti-SSEA-1	FH1	FH2/3	FH4	FH5	ACFH-18	SH1	SH2	624H12
Le ^X -nLc ₄	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Le ^X -nLc ₆		+	+	-	-	-	+	-	-
diLe ^X -nLc ₆		+	+	++	+	+	-	+	+
triLe ^X -nLc ₈		+	+	++	+	++	-	+	+
antigène ACFH-18						+++			

tableau 16

antigènes associés aux tumeurs portés les chaînes de type 2

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
Anti-SSEA-1 (Solter et Knowles, 1978) FH2, FH3 (Fukushi et al, 1984a) SH1 (Singhal et al, 1990)	épitope Lewis ^X	- adénocarcinomes du côlon (Hakomori et al, 1981; Brockhaus et al, 1982); du foie (Hakomori et al, 1982) et gastriques (Brockhaus et al, 1982); - cancers du poumon: épidermoïde, adénocarcinome, à petites cellules (Huang et al, 1983); - cancers du sein (Narita et al, 1993); - cancers de la vessie (Cordon-Cardo et al, 1988)
FH4 (Fukushi et al, 1984a) 624H12 (Kyogashima et al, 1989) SH2 (Singhal et al, 1990)	dimère Lewis ^X	- adénocarcinomes du foie et du côlon (Hakomori et al, 1982 et 1984); - cancers du poumon: épidermoïde, adénocarcinome, à grandes cellules (Zenita et al, 1988; Kyogashima et al, 1989)
FH5 et ACFH-18 (Fukushi et al, 1984a) 624H12 (Kyogashima et al, 1989)	trimère Lewis ^X	- adénocarcinomes du foie et du côlon (Hakomori et al, 1984); - cancers du poumon: épidermoïde, adénocarcinome, à grandes cellules (Zenita et al, 1988; Kyogashima et al, 1989)
ACFH-18 (Fukushi et al, 1984a)	antigène ACFH-18	- cancers de l'estomac et du côlon (Nudelman et al, 1988)

☛ Fucosylation respective en α 1-2 et α 1-3 des résidus de galactose et de N-Acétyleglucosamine conduisant à la synthèse du déterminant Lewis^Y: Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, distribué dans quelques types cellulaires et tissulaires normaux, mais fortement accumulé dans des cancers variés (Brown et al,1984). De nombreux anticorps monoclonaux dirigés contre cet épitope ont été préparés (tableaux 17 et 18, pages 59 et 60 respectivement). C'est ainsi que l'anticorps AH6, généré à partir d'une lignée tumorale gastrique (Abe et al,1983), réagit avec la quasi totalité des adénocarcinomes du côlon (Abe et al,1986; Kim et al,1986). Mis à part ce IV²FucIII³FucnLc₄Cer (Le^Y-nLc₄), ces tumeurs accumulent des structures Y étendues (figure 14, page 53): le VI²FucV³FucnLc₆Cer (Le^Y-nLc₆) et le majoritaire trifucosyl Lewis^Y: VI²FucV³FucIII³FucnLc₆Cer (Nudelman et al,1986b) réagissant respectivement de façon étroite avec les anticorps CC-1,-2 (Kim et al,1986) et KH1 (Kaizu et al,1986). Ces observations suggèrent que les structures Y, et plus particulièrement les structures étendues, sont des marqueurs importants de la malignité, pouvant être utiles dans le diagnostic du cancer du côlon notamment (Kim et al,1986). Dans cette optique, un anticorps chimérique appelé H18A a été récemment développé pour des essais diagnostics *in vivo* futurs (Kaneko et al,1993). Cette voie est doublement intéressante puisque le taux d'antigènes Lewis^Y solubles dans le sérum de patients cancéreux n'est pas trop élevé (Zenita et al,1988) et que les anticorps chimères ne provoquent pas l'apparition d'immunoglobulines humaines anti-souris (réaction HAMA). Enfin, il apparaît que les tumeurs Lewis^Y-positif de l'oesophage sont de plus mauvais pronostic que leurs contreparties négatives (Tauchi et al,1991).

tableau 17

réactivité des anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes Y

antigène	AH6	CC-1 et CC-2	KH1	MLuC1
Le ^Y -nLc ₄	+	-	-	+
Le ^Y -nLc ₆	+	+	-	-
Le ^Y /Le ^X -nLc ₆ (trifucosylLe ^Y)	+	-	+	-

tableau 18

antigènes associés aux tumeurs portés les chaînes de type 2

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
AH6 (Abe et al, 1983) MLuC1 (Agresti et al, 1988) H18A (Kaneko et al, 1993)	épitope Lewis ^Y	- cancers gastriques (Abe et al, 1983) - adénocarcinomes du côlon (Abe et al, 1986; Kim et al, 1986; Nudelman et al, 1986b) - cancers pulmonaires (Miyake et al, 1988; Leoni et al, 1992) - cancers de l'oesophage (Tauchi et al, 1991) - cancers de la vessie (Cordon-Cardo et al, 1988)
CC-1 et CC-2 (Kim et al, 1986)	Lewis ^Y -nLc6	- adénocarcinomes du côlon (Nudelman et al, 1986b; Kim et al, 1986)
KH1 (Kaizu et al, 1986)	trifucosyl Lewis ^Y	- adénocarcinomes du côlon (Nudelman et al, 1986b)

Les chaînes de type 2 sialylées en α 2-3 peuvent être converties en antigènes de type sialyl- Lewis^X (figure 14, page 53). Ces composés sont reconnus par les anticorps monoclonaux suivants (tableau 19, page 61): CSLEX1 (Fukushima et al, 1984) et AM-3 (Hanski et al, 1990) qui sont plutôt dirigés vers les structures courtes alors que le FH6 montre une spécificité plus étroite envers les chaînes étendues sialyl-Lewis^X-i ou sialyl-dimère Lewis^X (Fukushi et al, 1984b). De nombreuses études immunohistologiques et sérologiques ont associé la forte expression des structures sialyl-Lewis^X avec des adénocarcinomes humains variés (tableau 19, page 61). Parmi celles-ci, Itzkowitz et al. (1986) ont montré qu'entre les dérivés sialyl-Lewis^X mono et dimériques accumulés dans les cancers du côlon, seul le sialyl-Lewis^X-i défini par le FH6 était absent de la muqueuse normale.

Les résultats de cette étude sont identiques à l'investigation conduite sur les antigènes Lewis^Y (Kim et al, 1986) et corroborent l'hypothèse selon laquelle les chaînes de type 2 étendues sont, en général, plus «cancer-spécifiques» que leurs variantes courtes.

La régulation de la biosynthèse de ces polymères Lewis et sialyl-Lewis^X est dorénavant bien connue:

l'élongation des chaînes de type 2 précède la fucosylation et α 1-3 fucosyltransférase impliquée agit d'abord sur la GlcNAc externe puis sur les GlcNAc internes (Holmes et al, 1985). De même, comme pour la formation du sialyl-Lewis^a des chaînes de type 1, la sialylation se produit avant la fucosylation

(Holmes et al, 1986). Ceci sous-entend que les facteurs qui contrôlent la synthèse des polylactosamines contrôleraient aussi l'expression des antigènes Lewis étendus. Holmes et al. (1987b) ont montré que l'activité β 3-N-Acétyleglucosaminyltransférase (i) est 10 fois plus élevée dans les cancers du côlon que dans la muqueuse normale. Puisque l'activité α 3-fucosyltransférase est présente en taux comparables dans les muqueuses coliques normales et malignes, l'accumulation des chaînes de type 2 étendues fucosylées dans les adénocarcinomes humains apparaît être due à l'augmentation de l'activité β 3-glucosaminyltransférase (i) (Holmes et al, 1987b).

Ainsi, ces résultats indiquent que l'expression oncofoetale de ces antigènes Lewis dans les muqueuses coliques foetales et dans les adénocarcinomes mais pas dans la muqueuse adulte normale est due à l'expression rétrogénique des chaînes précurseurs de type 2 qui ne sont pas présentes dans les cellules épithéliales normales (Holmes et al, 1987a).

tableau 19

antigènes associés aux tumeurs portés les chaînes de type 2

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
CSLEX1 (Fukushima et al, 1984)	sialyl-Lewis ^X	- adénocarcinomes de l'estomac (Fukushima et al, 1984) - adénocarcinomes du côlon (Fukushima et al, 1984; Hanisch et al, 1992)
AM-3 (Hanski et al, 1990)		- adénocarcinomes du poumon (Fukushima et al, 1984; Hirota et al, 1985) - métastases hépatiques de tumeurs primaires du côlon (Taki et al, 1988)
FH6 (Fukushi et al, 1984b)	sialyl-Lewis ^X -i (mono ou difucosylé)	- adénocarcinomes du côlon (Fukushi et al, 1984b; Itzkowitz et al, 1986) - adénocarcinomes de l'estomac (Kannagi et al, 1986) - adénocarcinomes du poumon (Fukushi et al, 1984b; Kannagi et al, 1986; Miyake et al, 1988) - métastases hépatiques de tumeurs primaires du côlon (Hoff et al, 1989) - cancers de la vessie (Matsusako et al, 1991) - cancers du sein (Narita et al, 1993)

L'association de l'expression de l'haptène sialyl-Lewis^X avec le potentiel métastatique des cellules tumorales du côlon (Hoff et al, 1989) et de la vessie (Matsusako et al, 1991) est d'un grand intérêt depuis la découverte que la structure sialyl-Lewis^X, exprimée à la surface des neutrophiles et monocytes

humains, est impliquée dans l'interaction de ces cellules myéloïdes avec les cellules endothéliales activées des vaisseaux sanguins et ceci par l'intermédiaire de la molécule d'adhésion ELAM-1 (Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule) ou E-sélectine (Lowe et al,1990; Phillips et al,1990; Walz et al,1990). De plus l'isomère structural du sialyl-Lewis^X, le sialyl-Lewis^a, a été démontré être un ligand pour ELAM-1 (Bergh et al,1991), bien qu'absent des cellules leucocytaires humaines (Ohmari et al,1989). Les études menées par Takada et al. (1991) et par Iwai et al. (1993) respectivement sur des lignées tumorales coliques et pancréatiques, ont montré *in vitro* que ces cellules exprimant fortement le sialyl-Lewis^a se fixaient aux cellules endothéliales.

De toutes ces observations, nous pouvons tirer les enseignements suivants:

- ☛ en premier lieu, les taux sériques élevés de sialyl-Lewis^X et sialyl-Lewis^a glycoprotéiques relargués par les tumeurs pourraient interférer entre les cellules myéloïdes et les récepteurs ELAM-1, inhibant le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires et contribuant ainsi aux conditions immunodépressives observées chez beaucoup de patients cancéreux;
- ☛ deuxièmement, l'expression accrue de ces sucres sialyl-Lewis à la surface des cellules tumorales augmenterait donc les propriétés métastatiques de ces cellules, qui «détourneraient» ainsi la fonction originelle défensive de ces molécules d'adhésion.

Aussi, une nouvelle direction dans la thérapie anti-cancéreuse est-elle envisageable, celle conduisant à la conception de drogues thérapeutiques anti-adhésives tels des oligosaccharides ou des anticorps (Hakomori,1991).

D'ores et déjà, l'étude pronostique de l'expression de ces antigènes est entamée. S'il est encore controversé que l'expression du sialyl-Lewis^a affecte le devenir des patients atteints de cancers colorectaux, celle du sialyl-Lewis^X ne laisse aucun doute. Dès 1989, Hoff et al. avaient déjà montré dans les tumeurs du côlon, l'augmentation de l'expression du sialyl-Lewis^X avec l'acquisition du phénotype malin. Tout récemment, une confirmation a été apportée par Nakomori et al. (1993) qui ont démontré que le sialyl-Lewis^X, comme suspecté, est effectivement fortement associé à la malignité puisque 58% seulement des patients aux tumeurs sialyl-Lewis^X-positif survivaient au-delà de 5 ans contre plus de 90% des patients aux tumeurs sialyl-Lewis^X-négatif.

CARACTERISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGENES EXCLUSIVEMENT ASSOCIES AUX GLYCOLIPIDES

Les globosides

1. Biosynthèse des globosides

La biosynthèse des antigènes de la série globo (figure 15, page 64) débute par la conversion du lactosylcéramide en globotriaosylcéramide (Gb₃) possédant l'enchaînement caractéristique des globosides: Gal α 1-4Gal (Hakomori et al,1971), et se poursuit par la formation du globotétraosylcéramide (Gb₄ ou globoside). Ce composé est le glycolipide neutre majeur d'une grande quantité de cellules et tissus humains comme les hématies, le rein, le foie, la rate, les poumons et les tissus gastrointestinaux. La substitution du résidu β GalNAc du globoside par une N-Acétylgalactosamine conduit à l'antigène Forssman (Siddiqui et Hakomori,1971). L'espèce humaine a toujours été considérée comme Forssman-négative. Des études plus récentes ont montré la présence, chez 20 à 30% de la population, de petites quantités de glycolipides Forssman dans les tissus gastrointestinaux et pulmonaires. Cependant, chez la majorité de la population (70 à 80%), ces tissus n'en expriment pas (Buchbinder,1935).

Pendant de nombreuses années, aucune autre substitution du globoside n'a été trouvée dans les tissus humains. Ce n'est que récemment, et tout particulièrement dans les tératocarcinomes (Kannagi et al,1983), que furent trouvées des substitutions par du Gal β 1-3, Fuc α 1-2Gal β 1-3 (globo H), structures définies par les anticorps SSEA-3 et MBr1 (tableau 20, page 66). En dépit du fait que le globoside soit un composé majeur dans les membranes érythrocytaires humaines, les globosides exprimant des déterminants ABH y sont extrêmement mineurs (Kannagi et al,1984).

Enfin seulement deux globosides de nature acide ont été mis en évidence à ce jour: l'antigène SSEA-4 (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) dans les tératocarcinomes (Kannagi et al,1983) et son dérivé α 2-6 sialylé isolé de la fraction disialogangliosidique mineure d'hématies (Kundu et al,1983).

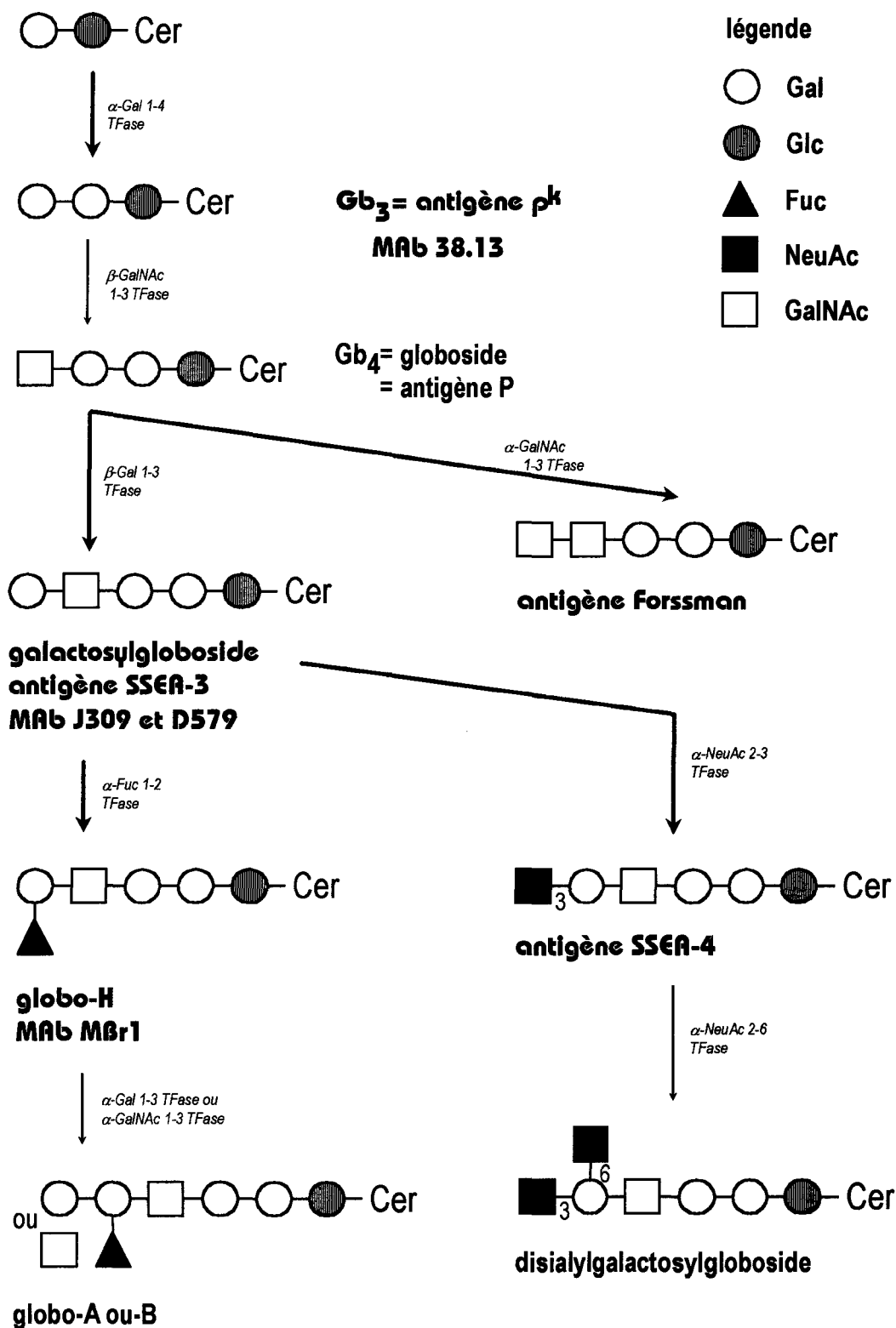


figure 15

biosynthèse des globosides (les structures en coloris marron sont accumulées dans différents cancers humains)



2. Voies oncofoetales (figure 15, page 64 et tableau 20, page 66)

Une grande accumulation de **globotriaosylcéramide** (Gb₃) a été observée dans les lymphomes de Burkitt. Un antigène commun à ces lymphomes appelé BLA (Burkitt's Lymphoma Antigen), défini par l'anticorps monoclonal de Rat 38.13 (Wiels et al,1981), a été identifié comme étant du Gb₃ (Nudelman et al,1983). Cet antigène a été auparavant identifié comme l'antigène du rare groupe sanguin p^k (Marcus et al,1981). Les hématies humaines normales contiennent peu de Gb₃ (5-10µg/10mg de protéine) alors que les hématies des sujets de groupe p^k en contiennent 5 fois plus. Les cellules de lymphome de Burkitt contiennent de grandes quantités de Gb₃ (200-800µg/10mg de protéine) (Marcus et al,1981). L'anticorps dirigé contre le Gb₃ ne réagissant pas contre les érythrocytes normaux, implique que cette petite quantité d'antigène est cryptique. Enfin, il a été rapporté que le Gb₃ était massivement accumulé dans les tumeurs testiculaires humaines (Ohyama et al,1990).

Dans la majorité de la population humaine, l'**antigène Forssman** est absent des poumons et muqueuses gastrointestinales normales. Cependant, il est détectable dans les cancers gastrointestinaux dérivés de tissus Forssman-négatif (Hakomori et al,1977). De même, certains cas de tumeurs pulmonaires (adénocarcinomes, cancers épidermoïdes ou à petites cellules) ainsi que le poumon foetal contiennent 50 à 90 fois plus de glycolipide Forssman que les tissus sains correspondants (Yoda et al,1980). Dans la majorité des cancers du poumon, une activité α3-N-acétylgalactosaminyltransférase accrue est observée (Taniguchi et al,1981) et par conséquent, il n'est pas étonnant que le glycolipide Forssman apparaisse dans les tissus Forssman-négatif. Cependant, la quantité de glycolipide Forssman dans de nombreux cancers humains est plutôt faible, et beaucoup d'anticorps anti-Forssman ne réagissent pas avec les tissus tumoraux, indiquant que l'antigénicité de ces tumeurs est d'une importance mineure.

L'antigène associé au cancer du sein défini par l'anticorps monoclonal MBr1 (Ménard et al,1983) a été identifié au **fucosylgalactosylgloboside** ou **globo-H** (Bremer et al,1984), déjà décrit dans les tératocarcinomes (Kannagi et al,1983) tout comme le **galactosylgloboside** réagissant fortement avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène de développement SSEA-3 (Shevinsky et al,1982) et identifié dans des tumeurs du sein (Schrump et al,1988). Les globosides n'ont, cependant, pas été rapportés comme étant cliniquement utilisables pour le diagnostic ou le monitoring de patients atteints de cancer.

tableau 20

globosides associés aux tumeurs

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
38.13 (Wiels et al, 1983)	Gb3	- tératocarcinomes (Kannagi et al, 1983) - lymphomes de Burkitt (Nudelman et al, 1983) - tumeurs testiculaires (Ohyama et al, 1990)
Forssman	Forssman	- cancers gastrointestinaux (Hakomori et al, 1977) - tumeurs pulmonaires (Yoda et al, 1980)
SSEA-3 (Shevinsky et al, 1982) Hu-J309, Hu-D579 (Schrump et al, 1988)	galactosylgloboside	- tératocarcinomes (Kannagi et al, 1983) - cancer du sein (Schrump et al, 1988)
SSEA-4	SSEA-4	- tératocarcinomes (Kannagi et al, 1983)
MBr1 (Ménard et al, 1983)	Globo-H	- cancer du sein (Ménard et al, 1983) - tératocarcinomes (Kannagi et al, 1983)

Les gangliosides

1. Biosynthèse des gangliosides

voir chapitre consacré à la structure des glycoconjugués, pages 25-26.

2. Voies oncofoetales

La majorité des antigènes de la série ganglio accumulés dans les cancers humains, et présents en faible quantité dans les tissus normaux, sont des précurseurs biosynthétiques de gangliosides plus complexes (figure 16, page 69). Outre un blocage dans la formation des gangliosides précurseurs, il a été démontré que la synthèse de GD₂ et de GD₃ était accrue dans les tissus tumoraux (Cheresh et al, 1986). L'accumulation de précurseurs résulterait donc des deux phénomènes précités. L'analyse de nombreuses tumeurs a montré que l'expression anormale de gangliosides était particulièrement accrue dans les cancers d'origine neurectodermique. Néanmoins, ces gangliosides se rencontrent également dans de nombreuses autres pathologies néoplasiques comme l'indique le tableau 21 (page 67).

tableau 21

gangliosides associés aux tumeurs

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
R24 (Dippold et al, 1980) 4.2 (Yeh et al, 1982) 2B2, IF4, MG21 (Hellström et al, 1985) DSG-1,-2,-3,-4 (Watarai et al, 1991) KM871 (Shitara et al, 1993)	GD ₃	- mélanome (Portoukalian et al, 1978; Pukel et al, 1982; Nudelman et al, 1982) - neuroblastome (Cheung et al, 1989) - gliome (Fredman, 1989b) - leucémie (Siddiqui et al, 1984) - hépatome (Ye et al, 1990) - médulloblastome (Gottfries et al, 1990)
OFA-I-2 (Cahan et al, 1982) Hu-L-72 (Irie et al, 1982) 126 (Cheresh et al, 1984a) 3F8 (Cheung et al, 1985) A1-425 (Tai et al, 1988)	GD ₂	- neuroblastome (Schulz et al, 1984) - mélanome (Cahan et al, 1982) - cancer du poumon à petites cellules (Cheresh et al, 1986) - ostéosarcome (Heiner et al, 1987) - gliome (Longee et al, 1991) - rétinoblastome (Portoukalian et al, 1993)
OFA-I-1 (Tai et al, 1983) Hu-L-55 (Irie et al, 1982) 5.3 (Natoli et al, 1986)	GM ₂	- mélanome (Irie et al, 1982; Tai et al, 1983) - hépatome (Higashi et al, 1987) - gliome (Fredman et al, 1989b)
F12 (Nilsson et al, 1986)	Fuc-GM ₁	- cancer du poumon à petites cellules (Nilsson et al, 1984)
D1.1 (Levine et al, 1984) ME311 (Thurin et al, 1985)	9-O-acétylGD ₃	- mélanome (Cheresh et al, 1984b et c; Thurin et al, 1985)
anti-AsGM ₂ (Young et al, 1979)	AsGM ₂	- maladie de Hodgkin (Kniep et al, 1983)

Les mélanocytes normaux contiennent majoritairement du GM₃ (>95%), une fraction mineure de GD₃ (<5%) et des traces de GM₂ (Carubia et al, 1984). Lors de la transformation néoplasique, la proportion GM₃:GD₃ passe de 19:1 à plus de 1:16 (Tsuchida et al, 1987). L'augmentation de ce rapport étant inversement proportionnel à la durée de survie des malades atteints de mélanome (Ravindranath et al, 1991). De façon concomitante avec cette accumulation de GD₃ (Portoukalian et al, 1978; Pukel et al, 1982; Nudelman et al, 1982), deux autres gangliosides apparaissent à la surface des mélanocytes malins. Ce sont le GD₂ (Cahan et al, 1982) et le 9-O-acétylGD₃ (Cheresh et al, 1984b et c; Thurin et al, 1985) qui, parmi tous les tissus normaux et tumoraux humains étudiés, n'a été uniquement trouvé que dans les mélanomes en excédant rarement 10% des acides sialiques totaux (Tsuchida et al, 1987).

Contrairement aux cellules de mélanome, dont le profil gangliosidique est très hétérogène, celles de neuroblastome expriment fortement du GD₂ (Schulz et al, 1984). La présence de GD₃ étant variable et

le GM₂ jamais retrouvé dans les tumeurs fraîches alors qu'il est exprimé dans les cellules en culture (Cheung et al,1989).

Outre les tumeurs d'origine neurectodermique, des marqueurs gangliosidiques ont été rapportés en particulier dans le cancer du poumon à petites cellules. Le GD₂ (Cheresh et al,1986) mais surtout le fucosyl-GM₁, bien que ne représentant que 20% des gangliosides totaux de ces tumeurs y est présent dans plus de 90% des cas (Nilsson et al,1984 et 1986). De façon intéressante, la distribution du fucosyl-GM₁ dans les tissus normaux - en dehors du système nerveux (Svennerholm et al,1989)- semble tout à fait restreinte et celui-ci n'est pas exprimé dans le poumon normal (Brezicka et al,1989).

Par ailleurs, l'anticorps F12 développé contre cet antigène (Nilsson et al,1986) montre une étonnante capacité à différencier le cancer du poumon à petites cellules des autres tumeurs pulmonaires, et ne présentant de surcroît aucune réaction croisée avec d'autres antigènes (Brezicka et al,1989). L'anticorps F12 représente donc un outil de choix pour la tomoscintigraphie pulmonaire ou pour le dosage sérique du Fucosyl-GM₁ relargué par les cellules tumorales (Vangsted et al,1991). Certains gangliosides étant fortement exprimés sur les cellules tumorales, ceux-ci ont été utilisés comme cibles pour une immunothérapie passive. Des essais cliniques ainsi menés sur des patients atteints de mélanome ont montré quelques régressions partielles après injection intraveineuse d'anticorps murins anti-GD₃ (Houghton et al,1985). D'excellents résultats (16 réponses/ 21 nodules traités, dont 10 régressions complètes) ont été obtenus par injection intralésionnelle d'anticorps monoclonaux humains L72 anti-GD₂ (Irie et Morton,1986), et ce sans effets secondaires. Des tentatives similaires ont été également conduites sur des patients atteints de neuroblastome avec l'anticorps murin 3F8 anti-GD₂ (Cheung et al,1987). Une voie prometteuse dans ce type de thérapie semble être l'utilisation d'anticorps chimères Souris/Homme parant aux problèmes posés par l'utilisation d'anticorps 100% murins ou 100% humains (Shitara et al,1993). Plusieurs équipes ont cherché à induire une immunisation contre des gangliosides par une vaccination anti-tumorale. Des patients atteints de mélanome ont été ainsi immunisés avec du GD₃ purifié dans le but d'induire une immunité active chez ces patients, mais aucun anticorps anti-GD₃ n'a été observé (Livingston,1988). Des tentatives plus anciennes d'immunisation utilisant un mélange de gangliosides associés au mélanome avaient montré une réponse anticorps contre le GD₂ et le GM₂ mais pas contre le GD₃ (Tai et al,1985) indiquant que le GD₃ n'était pas immunogénique chez l'Homme. Par contre, la présence d'autoanticorps anti-O-acétylGD₃ dans le sérum de patients a été démontrée par

l'utilisation d'une lectine se liant spécifiquement aux gangliosides O-acétylés (Ravindranath et al,1985) et bloquant la fixation de ces autoanticorps sur une lignée cellulaire exprimant majoritairement du O-acétylGD₃ (Ravindranath et al,1988). De plus, ces mêmes auteurs ont observé que les autoanticorps présentaient une réaction croisée avec le GD₃ (Ravindranath et al,1989). Le postulat posé par ces auteurs est le suivant: la O-acétylation rendrait le GD₃ immunogénique chez les patients atteints de mélanome. En effet, trouvé dans 83% des biopsies de mélanome (Tsuchida et al,1987), le O-acétylGD₃ est un composé mineur de ces cellules et il peut être insuffisant pour provoquer une forte immunogénicité chez les patients sans une immunisation délibérée. Ainsi, le O-acétylGD₃ induit des anticorps réagissant contre le GD₃, l'immunisation de ces patients peut être une approche intéressante pour inhiber la croissance des cellules tumorales. Une telle immunothérapie active pouvant être appliquée aux autres néoplasies dans lesquelles s'accumule du GD₃.

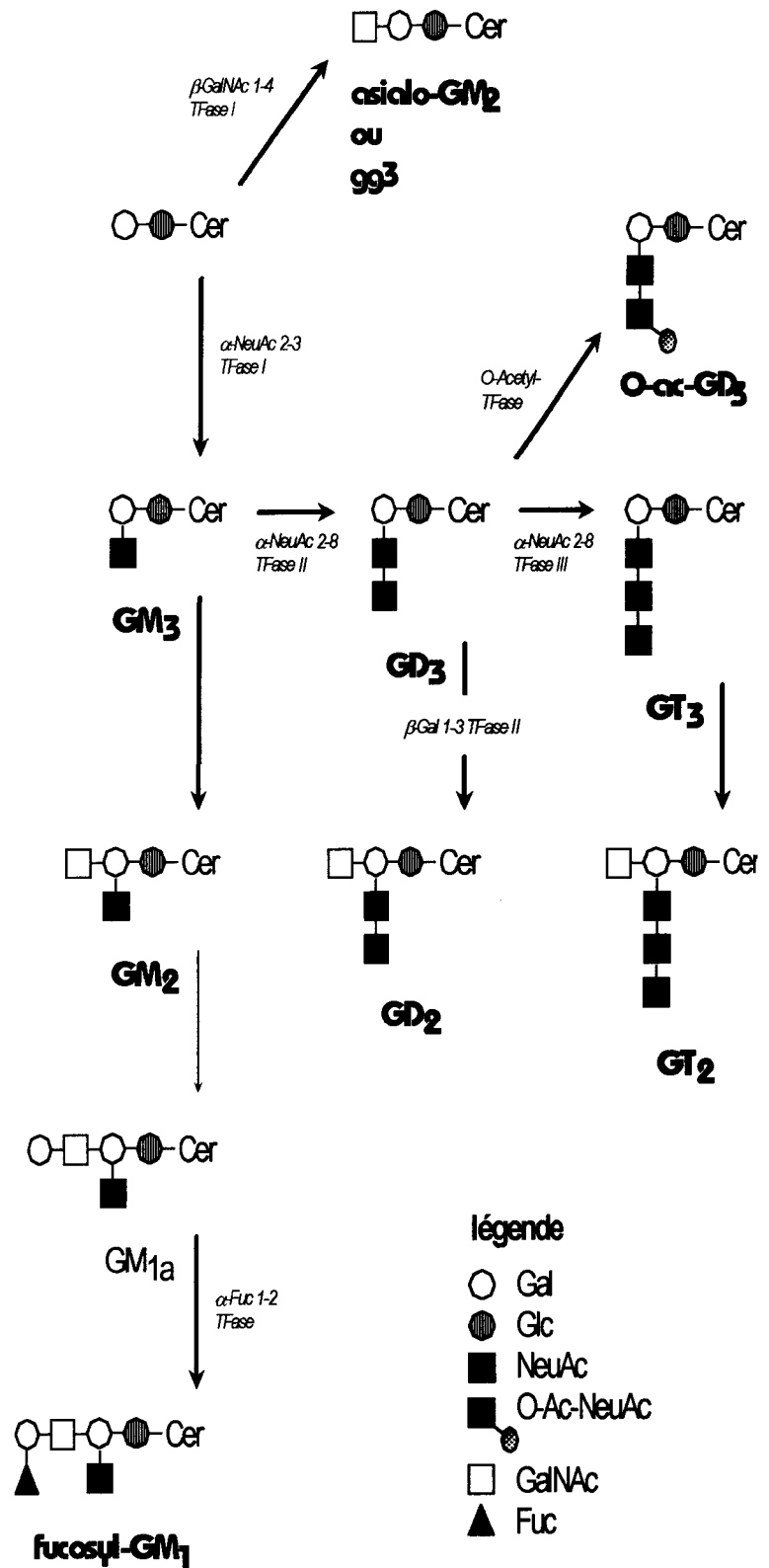


figure 16

principales voies oncofoetales gangliosidiques



CARACTERISTIQUES NORMALES ET ONCOFOETALES DES ANTIGENES EXCLUSIVEMENT ASSOCIES AUX GLYCOPROTEINES

Les antigènes T, Tn et sialyl Tn

Dans les glycoprotéines de type mucine, deux processus fondamentaux de formation d'antigènes tumoraux sont rencontrés (figure 17, page 71):

- ☛ une synthèse bloquée caractérisée par la présence des déterminants antigéniques Tn (GalNAc- α -Ser/Thr) et T (Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr), qui sont accumulés dans une très large proportion d'adénocarcinomes humains (Springer, 1984);
- ☛ une néosynthèse représentée par l'expression de l'antigène sialyl Tn (Kjeldsen et al, 1988) où l'addition d'un résidu d'acide sialique sur le précurseur Tn clôt la glycosylation.

Dans les tissus normaux, ces antigènes de très courte taille peuvent coexister avec d'autres oligosaccharides plus élaborés qui les masquent et les protègent d'une réactivité lectinique ou immunologique. Avec la transformation maligne apparaît souvent une glycosylation incomplète résultant en la synthèse d'oligosaccharides à courte chaîne. Ceci provoque le démasquage de ces structures jusqu'alors cryptiques (Hakomori, 1985).

L'antigène Tn présentant une antigénicité croisée avec le groupe sanguin A, est détectable par de nombreuses lectines à GalNAc (*Helix pomatia*, *Vicia villosa*...) qui agglutinent les érythrocytes de ce groupe (Dahr et al, 1974; Tollefsen et Kornfeld, 1983). Des anticorps monoclonaux ont été aussi développés, en particulier à partir de la lignée cellulaire Lu65 de cancer épidermoïde pulmonaire: les NCC-LU-35 et -81 présentent des réactions croisées avec les antigènes de groupe A (Hirohashi et al, 1985), contrairement au CU-1 qui réagit indépendamment du statut ABH du patient (Takahashi et al, 1988). Les études immunohistochimiques (tableau 22, page 72) menées avec le CU-1 ou *Vicia villosa*, ont montré que l'antigène Tn était fortement exprimé dans 70 à 90% des tumeurs pulmonaires, gastriques, coliques, mammaires et ovariennes avec des réactivités basses voire nulles avec les tissus sains correspondants (Takahashi et al, 1988; Itzkowitz et al, 1989). En outre, sa présence est souvent associée avec celle du sialyl Tn, sa forme sialylée, qui est abondamment exprimée dans les tumeurs gastriques, pancréatiques, colorectales et ovariennes. Malgré cette absence de spécificité d'organe, ce

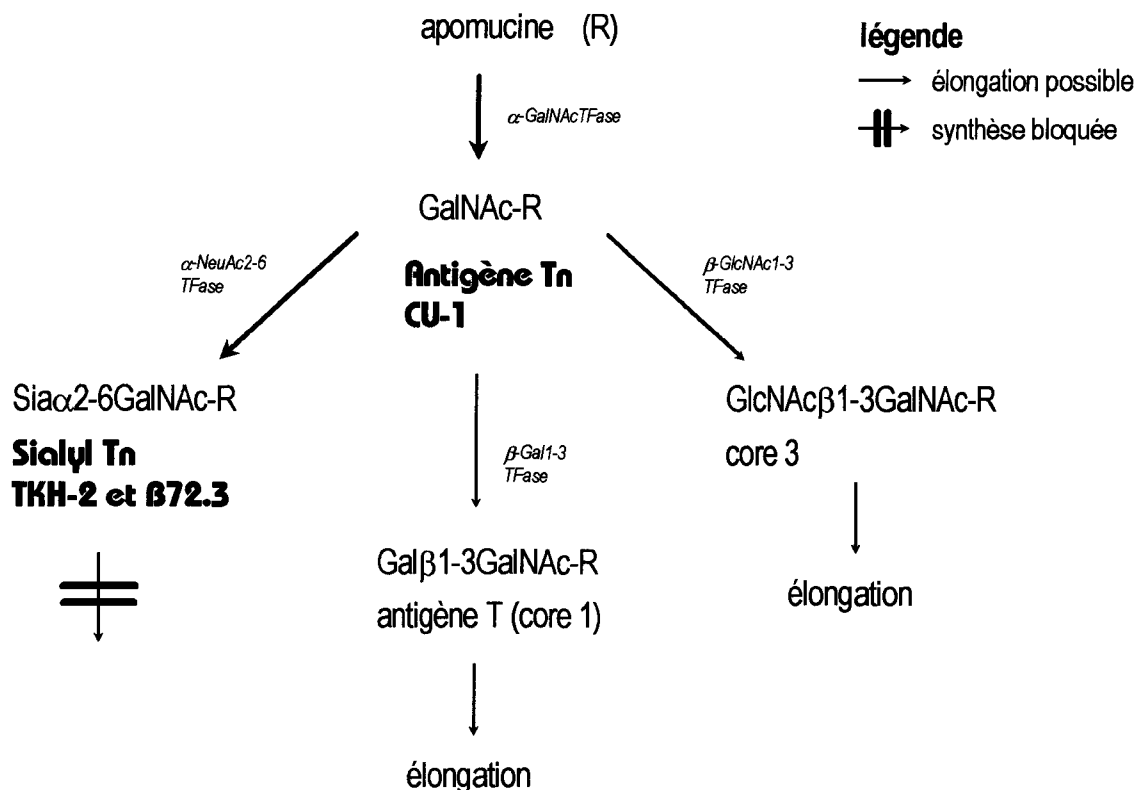


figure 17

biosynthèse des antigènes T, Tn et sialyl Tn (les structures en caractères gras sont accumulées dans différents cancers humains)

déterminant est quand même très fortement lié à la pathologie cancéreuse, son expression étant très restreinte dans les tissus normaux. Il représente un marqueur tumoral d'avenir, en particulier dans ces adénocarcinomes d'organes producteurs de mucines (pour revue: Yonezawa et al,1992) Des anticorps monoclonaux: MLS 102 et TKH-2 (Kurosaka et al,1988; Kjeldsen et al,1988) ont été établis, respectivement à partir d'une lignée cellulaire du côlon et de mucines sous-maxillaires ovines (OSM). Cette dernière procédure est fondée sur la découverte de grandes quantités d'antigènes sialyl Tn dans ces mucines (Pigman et Gottschalk,1966) et sur l'inhibition spécifique de ces anticorps par le disaccharide de synthèse NeuAc α 2-6GalNAc- α -Ser: ces deux anticorps présentent une réactivité identique à celle de l'anticorps B72.3 jusqu'alors utilisé (Thor et al,1986).

Les études conduites par le groupe de Steven Itzkowitz ont montré que la présence du sialyl Tn dans les tumeurs colorectales était un facteur associé à un mauvais pronostic. Effectivement, son expression semble corrélative avec l'acquisition du phénotype malin: il est peu ou pas exprimé dans la muqueuse

normale, présent dans 50% des polypes prémalins et dans plus de 90% des tumeurs (Itzkowitz et al,1992); et tous les patients à la tumeur antigène-négatif survivent au-delà de 5 ans contre 73% des patients antigène-positif (Itzkowitz et al,1990).

L'association entre l'expression du sialyl Tn et une issue défavorable impliquerait que cet antigène puisse jouer un rôle dans le comportement des cellules tumorales, en interférant avec le système immunitaire. Un élément de réponse a été apporté à cette hypothèse par Ogata et al. (1992) qui ont montré *in vitro* l'action inhibitrice de fortes concentrations de sialyl Tn sur les cellules tueuses naturelles (NK). Ces mucines sialylées pourraient-elles ainsi exercer un effet «cytoprotecteur» pour la cellule tumorale, lui permettant d'échapper à sa détection et sa destruction par le système immunitaire.

L'antigène T (Thomsen-Friedenreich) a été associé au disaccharide Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr, le core 1 des chaînes O-glycanniques de type mucine, lequel est fortement réactif vis à vis de la lectine de cacahuète PNA (Lotan et al,1975). L'expression de cet antigène dans diverses tumeurs a été montrée par de nombreuses études histochimiques utilisant la PNA ou divers anticorps (Yuan et al,1986; Itzkowitz et al,1989).

tableau 22

antigènes glycoprotéiques Tn et sialyl Tn associés aux tumeurs

anticorps	structure	principales localisations tissulaires
NCC-LU-35 et -81 (Hirohashi et al,1985) CU-1 (Takahashi et al,1988)	Tn	essentiellement: côlon, poumon, estomac, sein et ovaire (Takahashi et al,1988; Itzkowitz et al,1989)
MLS 102 (Kurosaka et al,1988) TKH-2 (Kjeldsen et al,1988) B72.3 (Colcher et al,1981)	sialyl Tn	essentiellement: côlon, pancréas, ovaire et estomac (pour revue: Yonezawa et al,1992)

Cependant, contrairement aux antigènes Tn et sialyl Tn, la nature d'antigène associé du T reste équivoque. En effet, des études immunohistochimiques réalisées avec des anticorps monoclonaux préparés à partir de disaccharides de synthèse Gal β 1-3GalNAc d'anoméries α ou β , ont montré que

La substitution du galactose terminal par de l'acide sialique lié en α 2-3 ou par une unité N-Acétyllactosaminique n'inhibe pas la fixation de L-PHA (Cummings et Kornfeld,1982). Par contre cette reconnaissance est réduite par l'addition de résidus α 2-6 sialylés ou de fucose respectivement liés aux résidus galactose et N-Acétyleglucosamine de l'antenne β 1-6; et elle est complètement abolie si cette substitution se présente sur l'antenne β 1-2 (Bierhuizen et al,1988).

«These observations ... suggest that acquisition of the L-PHA-binding oligosaccharides are not required for tumor formation but are associated with increased metastatic potential»

Telle était la conclusion d'un article dans lequel James Dennis démontrait qu'il existait une relation directe entre l'expression de l'antenne β 1-6 et l'augmentation du potentiel métastatique dans trois systèmes tumoraux murins qu'il avait étudié (Dennis et al,1987).

Chez l'Homme, une expression accrue de glycannes tri- et tétra-antennés avait déjà été corrélée avec le degré de transformation et l'invasivité de lignées cellulaires uroépithéliales (Debray et al,1986). Et très récemment, des études histochimiques ont montré que les cancers du côlon et du sein présentaient une expression accrue d'oligosaccharides réactifs à L-PHA et associée à la progression tumorale, et même au potentiel métastatique pour les tumeurs du côlon (Fernandes et al,1991).

Ainsi, une corrélation existerait-elle entre l'augmentation de l'activité β 6-GlcNAc-TFase V et l'accentuation du phénotype malin pouvant se traduire par l'expression de séquences oligosaccharidiques associées aux tumeurs comme le sont les structures Lewis^x, Lewis^y et sialyl-Lewis^x étendues (figure 18, page 75). De fait, il a été clairement démontré que les chaînes de type 2 sont préférentiellement présentes sur les structures N-glycanniques les plus branchées, c'est à dire celles possédant une antenne β 1-6. C'est ainsi que l'augmentation du branchement - notamment en β 1-6 - des glycannes de cellules BHK transformées, est associée à celle du contenu N-Acétyllactosaminique (Pierce et Arango,1986). Inversement, la perte de l'activité β 6-GlcNAc-TFase V est concomitante à celle du contenu N-Acétyllactosaminique (Cummings et Kornfeld,1984). Par ailleurs, Van Den Eijnden et al. (1988) ont montré que la β 3-N-Acétyleglucosaminyltransférase (i) de cellules tumorales de Novikoff substituait préférentiellement le site de fixation de L-PHA.

Puisque les antigènes étendus de type 2 cancer-spécifiques apparaissent être présents abondamment sous forme glycoprotéique dans le sérum (Singhal et al,1990), un screening associant les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes et la lectine L-PHA (indépendante de l'expression de ces

épitopes) pourrait se révéler utile dans une optique diagnostique, en particulier la détermination du stade de la maladie.

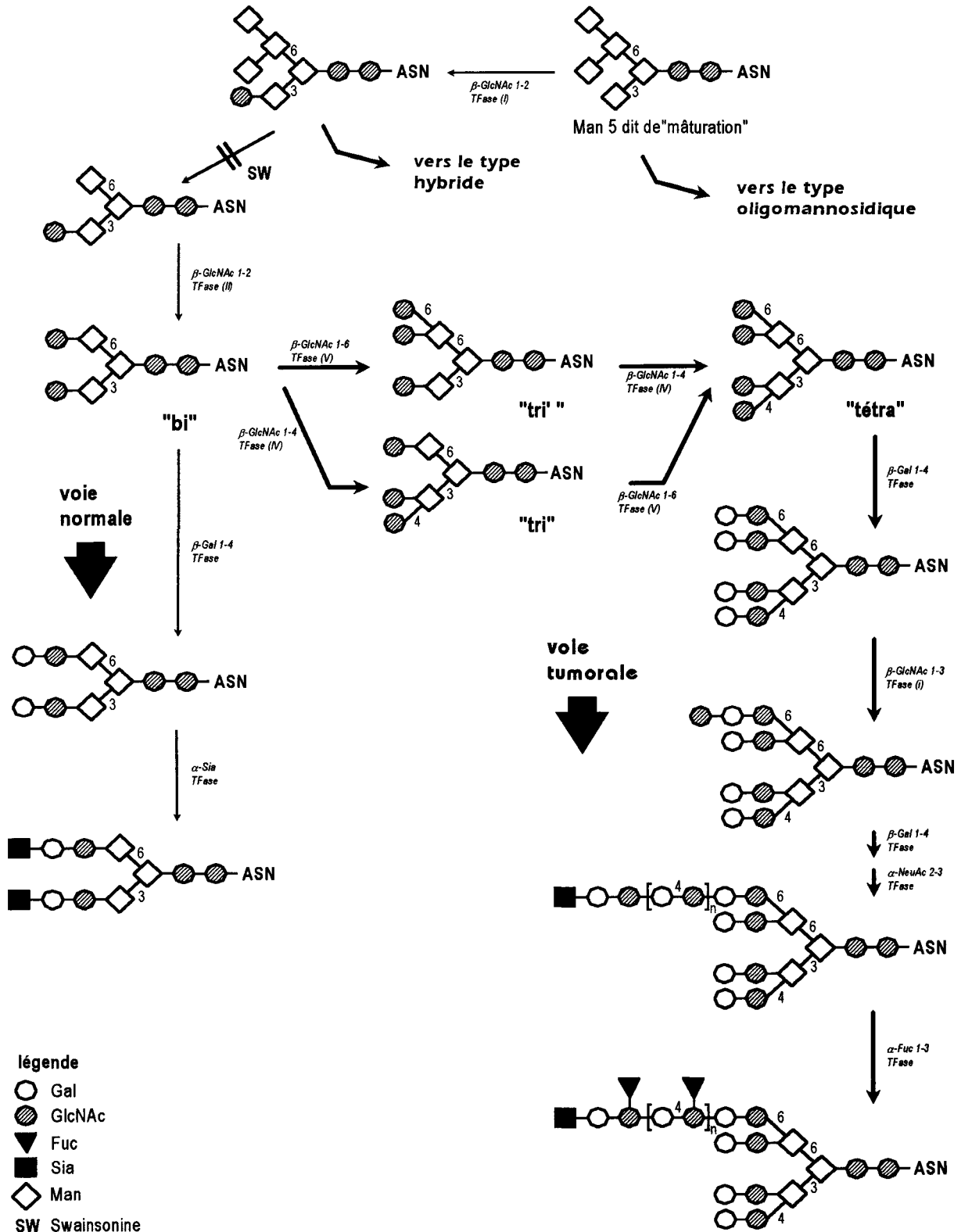


figure 18

biosynthèses normale et tumorale des N-glycannes de type complexe (d'après Dennis et al, 1992)



CONCLUSION

Dans les tumeurs expérimentales et humaines, la glycosylation aberrante est le phénomène le plus communément associé avec la transformation maligne.

Les antigènes glucidiques, résultant d'une synthèse incomplète ou d'une néosynthèse, sont accumulés en forte densité, vraisemblablement dans une conformation nouvelle, à la surface des cellules tumorales.

Les antigènes dont la structure épitopique est clairement identifiée ont été discutés selon la classification conventionnelle: séries lacto, néolacto, globo et ganglio.

Les grands axes de cette glycosylation anormale sont énumérés dans le tableau 23 ci-après.

tableau 23

directions de la glycosylation aberrante

1/ changements dans la série lacto de type 1

- ❖ synthèse accrue de 2-3 sialyl-type1, 2-3 sialyl-Lewis^a, disialyl-Lewis^a, Lewis^a, Lewis^b.
- ❖ élongation des chaînes: dimère Le^a, Le^a/Le^b, Le^a/Le^x.

2/ changements dans la série lacto de type 2

- ❖ néosynthèse de glycolipides à épitope NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc.
- ❖ élongation des chaînes: nLc4, nLc6, nLc8...
- ❖ fucosylation et sialylation des chaînes linéaires: Le^x, Le^y, dimère Le^x, trimère Le^x, sialyl Le^x, sialyl Le^x-i, trifucosyl Le^y...

3/ changements dans la série ganglio

- ❖ accumulation de GD3, GD2, GM2, 9-O-Acétyle-GD3 et Fucosyl-GM1.

4/ changements dans la série globo

- ❖ accumulation de Gb3.
- ❖ néosynthèse des structures étendues: SSEA-3, Globo-H

5/ changements dans les mucines

- ❖ accumulation de Tn.
- ❖ néosynthèse: sialyl Tn

6/ changements dans les N-glycannes

- ❖ antennarisation en β 1-6
-

De nombreux anticorps monoclonaux reconnaissant les antigènes glucidiques associés aux cancers et leur organisation à la surface cellulaire, ont été développés.

Ces épitopes glycaniques et les anticorps spécifiques de ces structures sont exploités pour le développement de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

**PROCEDURES
EXPERIMENTALES
ET
RESULTATS**

Dans ce chapitre, nous présenterons nos travaux personnels réalisés sur les différentes classes de glycoconjugués présents dans le méconium.

Les directions générales de ce fractionnement sont présentées dans la figure 19 ci-après.

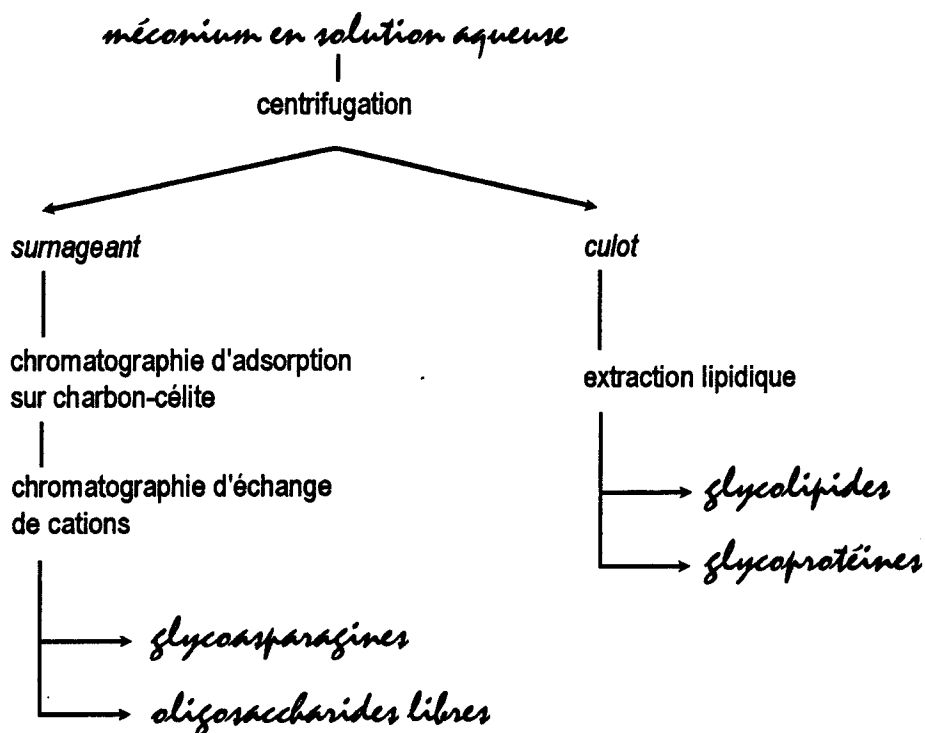


figure 19

directions générales du fractionnement des constituants glucidiques du méconium

LES GLYCOPROTEINES

L'objectif de notre travail a consisté en la mise au point d'une technique originale de libération des chaînes O-glycanniques des glycoprotéines du méconium permettant la synthèse ultérieure de néoglycoconjugués destinés à la fabrication d'anticorps «anti-sucres». Le schéma de fractionnement de ces O-glycosylprotéines est présenté dans la figure 20 ci-dessous.

Les résultats obtenus pour les oligosaccharides neutres sont rassemblés dans l'article soumis à publication présenté dans les pages suivantes. Quant au matériel de nature acide, celui-ci est actuellement en cours d'étude (résultats non montrés).

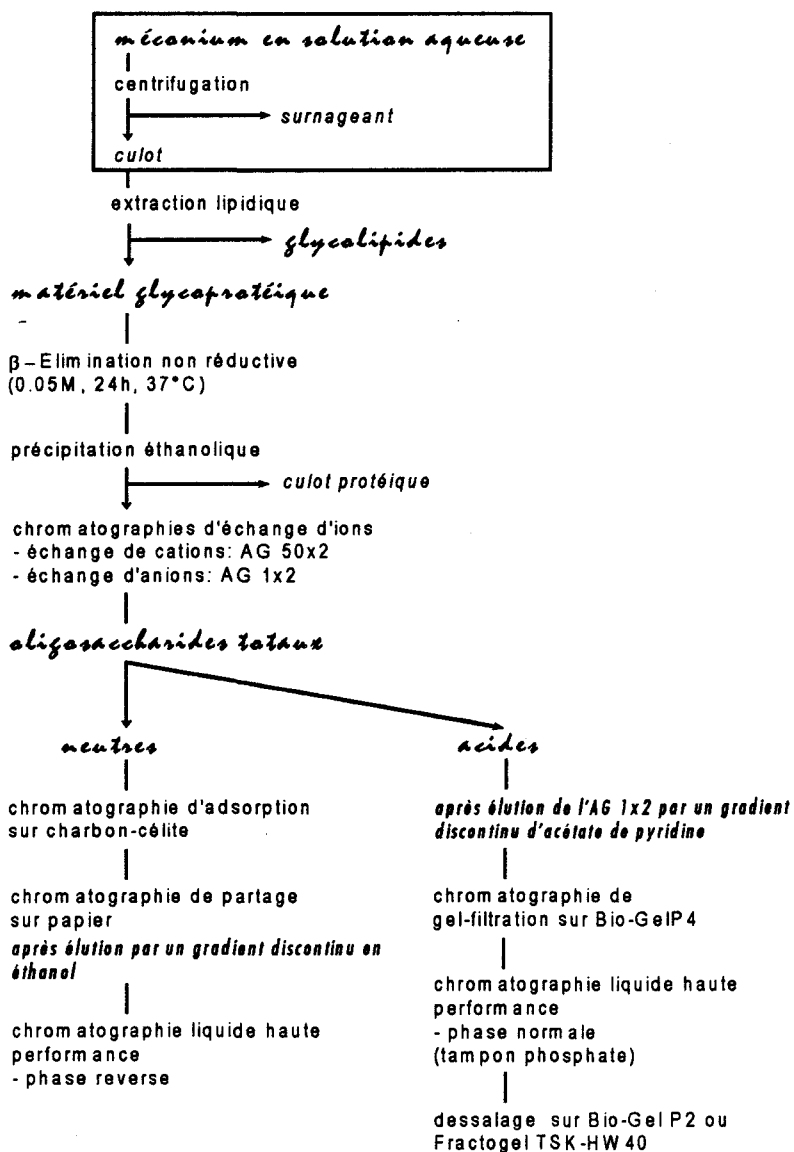


figure 20

schéma de fractionnement des glycoprotéines de type O-glycanniques du méconium

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF OLIGOSACCHARIDES RELEASED BY NON-REDUCTIVE β -ELIMINATION OF NEW-BORN MECONIUM MUCINS

Alternative method for the large-scale preparation of oligosaccharides antigens useful for the synthesis of neoglycoconjugates.

Olivier Cuvillier, Jean-Michel Wieruszkeski, Jean-Claude Michalski and Gérard Strecker.

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 111 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Tel : (33) 20.43.41.46

Fax : (33) 20.43.65.55

Key words: new-born meconium, mucins, non-reductive β -Elimination, oligosaccharides, 400 MHz - $^1\text{H-NMR}$.

Abbreviations: HPLC, high-performance liquid chromatography; TLC, thin-layer chromatography; NMR, nuclear magnetic resonance; COSY, correlated spectroscopy; 2D, two-dimensional; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; Gal, D-galactose; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Fuc, L-fucose; ManNAc, N-acetyl-D-mannosamine; AllNAc, N-acetyl-D-allosamine; TalNAc, N-acetyl-D-tallosamine.

ABSTRACT

Oligosaccharides were released from human meconium glycoproteins by non-reductive alkaline treatment, and furtherly separated by a combination of conventional chromatographic methods such as charcoal, ion-exchange, paper chromatography and high-performance liquid chromatography. The structures of the 19 major neutral components ranging from di- to pentasaccharides has been established by 400 MHz $^1\text{H-NMR}$. All the oligosaccharides possess linear structures and differ by their terminal-reducing monosaccharides. Oligosaccharides terminated with Gal or GlcNAc result from peeling reactions on branched structures which normally occur in new-born meconium mucins. Oligosaccharides terminated with TalNAc result from epimerization of the GalNAc residue in the alkaline medium. Other compounds with AllNAc and ManNAc in terminal reducing position result from

epimerization of terminal GlcNAc residue formed after peeling. Four of these oligosaccharides are described for the first time in human meconium mucins: GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc, Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6)GalNAc and GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)GalNAc. Moreover, most of the oligosaccharides bear blood group antigenic determinants such as H, A, Le^a or Le^x, and may be employed for the synthesis of neoglycoconjugates (e.g neoglycolipids) using the reductive amination procedure.

INTRODUCTION

Human meconium present in the gastrointestinal tract of the neonate is mainly composed of extruded epithelial cells accumulated during the fetal development. The main components are constituted of mucin types glycoproteins possessing an array of O-linked oligosaccharides which express differentiation or blood-group antigens recognized by monoclonal antibodies (Gooi et al., 1981; Gooi et al., 1982; Gooi et al., 1983; Feizi et al., 1985). In this respect, new-born meconium represents an easily accessible source for the large-scale preparation of such antigens which may be used for the synthesis of neoglycoconjugates (neoglycoproteins or neoglycolipids). These probes may be used as reference compounds in a number of biological studies which leads to explore the biological roles of carbohydrates (Feizi, 1988). Generally, the O-linked carbohydrate chains of "mucin-type" glycoproteins are released by an alkali-catalyzed β -Elimination reaction in presence of reductive agent such as sodium borohydride, which avoid further degradation of oligosaccharides in the alkali-medium (Iyer & Carlson, 1971).

This last point constitutes a limitation for the further utilization of the released oligosaccharide-alditols in the synthesis of neoglycoconjugates by the widely used reductive-amination procedure (Gray, 1978). In our effort to develop large-scale preparation methods of oligosaccharides of biological interest, we utilized a β -Elimination procedure without reductive agent. We report here the separation protocols and elucidation of the structure of the major neutral oligosaccharides released from the meconium mucin-type glycoproteins after alkaline treatment. Special emphasis is placed on the nature of the terminal reducing monosaccharides.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials.

Activated charcoal was from Sigma ; Whatman n°3 paper was from Whatman ; AG1x2 (200-400 mesh, CH₃COO⁻ form) and AG50x2 (200-400 mesh, H⁺ form) ion-exchange resins and Bio-Gel P2 (200-400 mesh) were from Bio-Rad . Deuterium oxide 99.96 atom %, 4-hexadecylaniline and sodium cyanoborohydride were from Aldrich..

Preparation of new-born meconium glycoproteins.

Meconium samples (2 kg) were collected from one-day-old human neonates and pooled independently of blood group status. Free oligosaccharides were removed by homogenisation of meconium in water followed by centrifugation at 3000 rpm for 30 min, as previously described (Herlant-Peers et al.,1981). The insoluble material containing proteins was then submitted to lipidic extraction with chloroform / methanol / water (5:10:3, by vol.) (Svennerholm & Fredman,1980). After centrifugation (2000 rpm, 10 min), the delipidated protein pellet is resuspended in 3 volumes of distilled water and lyophilized.

Release of oligosaccharides from meconium by non-reductive alkaline degradation.

The protein pellet was treated by sodium hydroxide 0.05 M for 24 h at 37°C to release the oligosaccharides. The reaction was stopped by acidification with acetic acid until pH 7.5. The insoluble material was then precipitated by the addition of ethanol (50 %, v/v). After centrifugation (4000 rpm, 30 min), the supernatant was evaporated to dryness and the residue dissolved in water.

Fractionation of oligosaccharides.

The resulting heterogeneous population of oligosaccharides was applied to two combined columns (3 x 30 cm) of AG 50 x 2 (200-400 mesh, hydrogen form) and AG 1 x 2 (200-400 mesh, acetate form). The columns were rinsed with two liters of water. The eluted fraction constituted by neutral oligosaccharides was submitted to adsorption chromatography on activated charcoal-celite column (40 x 6 cm). The column was washed with distilled water and adsorbed material stepwise eluted with ethanol of increased concentration (4 to 20 %). Further separation of the oligosaccharides was carried out by descending paper chromatography on Whatman n°3 paper using a solvent system of ethyl acetate / pyridine / acetic

acid / Water (5:5:1:3, by vol.), performed during 18 hours. Carbohydrates were stained with aniline oxalate reagent (Partridge, 1950).

HPLC separation of neutral oligosaccharides on octadecylsilyl bonded silica.

Each fraction obtained by preparative paper chromatography was further subfractionated by reverse phase HPLC using a Lichrosorb RP 18 column (250 x 10 mm, particle size 7 μm , Merck). Distilled water was used as eluent at a flow rate of 1 ml /min. Detection was by UV absorbance at 206 nm.

NMR spectroscopy

The 400 MHz ^1H -NMR experiments were performed on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mixed probehead, operating in the pulse Fourier transform mode and controlled by an Aspect 3000 computer. Each oligosaccharide was dissolved in 0.45 ml D_2O after three exchanges with D_2O (99.96 % atom ^2H) and intermediate lyophilisations. The products were analyzed at 300 K with a spectral width of 3000 Hz for 16 K frequency domain points and time domain data points giving a final digital resolution of 0.365 Hz / point. The 2D homonuclear COSY experiments were performed using the standard Bruker pulse program COSY. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm in $^2\text{H}_2\text{O}$ at 27°C) with an accuracy of 0.002 ppm.

Synthesis of neoglycolipids

Oligosaccharides were condensed to 4-hexadecylaniline by the reductive amination procedure as previously described (Ramphal et al., 1991). Briefly, 100 mg 4-hexadecylaniline was added to 500 μL of a solution containing 35 mg cyanoborohydride, 3.5 ml methanol and 400 μl acetic acid. The solution was heated and 1 mg of oligosaccharide solubilized in 20 μl of water was added. After 90 min at 80°C, the solution was cooled, mixed with 2 ml of chloroform and water (1:1, by vol.) and centrifuged. The lower phase was discarded. The upper phase was washed again with chloroform (1 ml), dried, dissolved in methanol (2 ml) and centrifuged. The pellet containing uncoupled oligosaccharide was discarded.

RESULTS

Isolation and purification of oligosaccharides released from human meconium mucins by non-reductive β -Elimination.

Oligosaccharides were released from the mucins by alkaline treatment (NaOH 0.05 M, 37°C, 24 h). After anion-exchange on AG resin, a neutral fraction was obtained corresponding to 40 % of the initial mucin carbohydrate content. As a first separation step this oligosaccharide mixture was submitted to charcoal adsorption chromatography. Oligosaccharides were desorbed from the column by stepwise elution with ethanol. Each "charcoal fraction" was analyzed by paper-chromatography. 13 fractions listed from A to M (Figure 1) were further obtained by preparative paper chromatography. Each "paper" oligosaccharidic fraction was further subfractionated by reverse-phase HPLC on C₁₈ column (Figure 2).

Generally, each fraction obtained by paper-chromatography subdivides in several peaks by C₁₈ HPLC. Since some overlapping was observed between fractions obtained by paper chromatography, structural analysis was undergone only on the major compound obtained for each fraction after reverse-phase HPLC.

Structure determination of neutral oligosaccharides

The primary structures of the oligosaccharides obtained by non-reductive β -Elimination of human newborn meconium glycoproteins, listed in Table 1, were established essentially by 400 MHz ¹H-NMR spectroscopy.

Oligosaccharide A.

The two anomeric protons observed at $\delta = 5.241$ and 4.702 ppm were assigned to α -TalNAc and α -Gal respectively, according to the pattern of their coupling constants $J_{2,3}$; $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ (Figure 3). The anomeric proton of β -TalNAc was found at $\delta = 5.058$ ppm. The ¹³C-NMR data were obtained on the heteronuclear COSY spectrum, which exhibits an unusual downfield value for Gal C-2, at $\delta = 79.27$ ppm (Table 2). The downfield shifted C-3 atom resonance of α -TalNAc agree the following sequence proposed for oligosaccharide A : Gal(β 1-3)TalNAc.

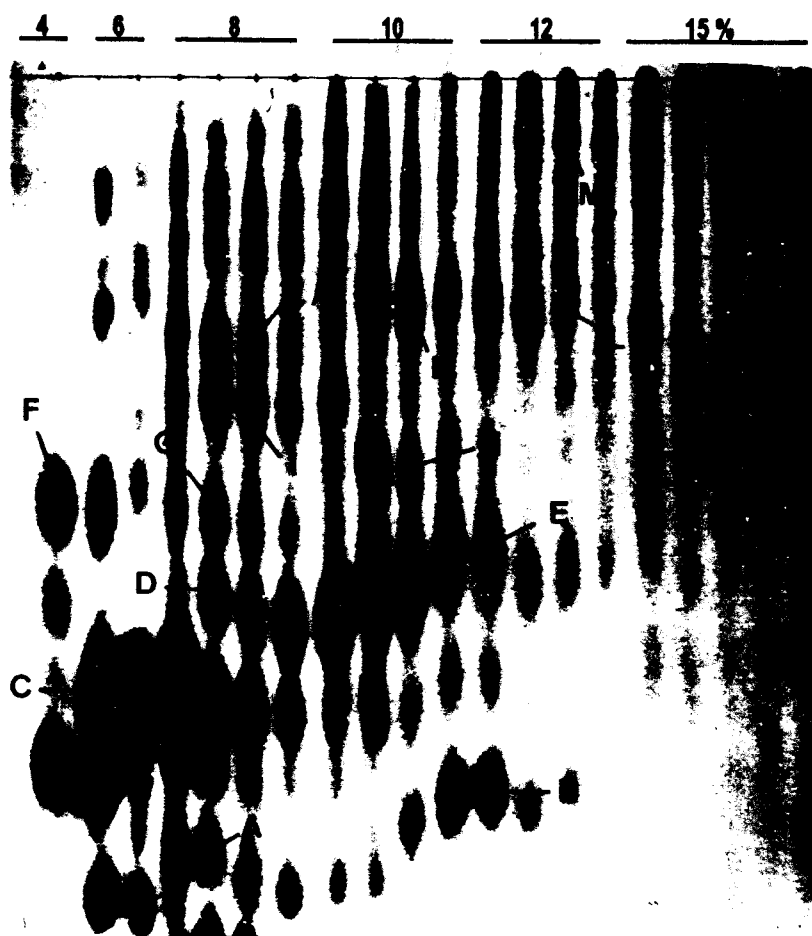


Figure 1. Paper chromatography of neutral oligosaccharides eluted from a charcoal-celite column by a discontinuous gradient of ethanol.

time of migration: 18 hours.

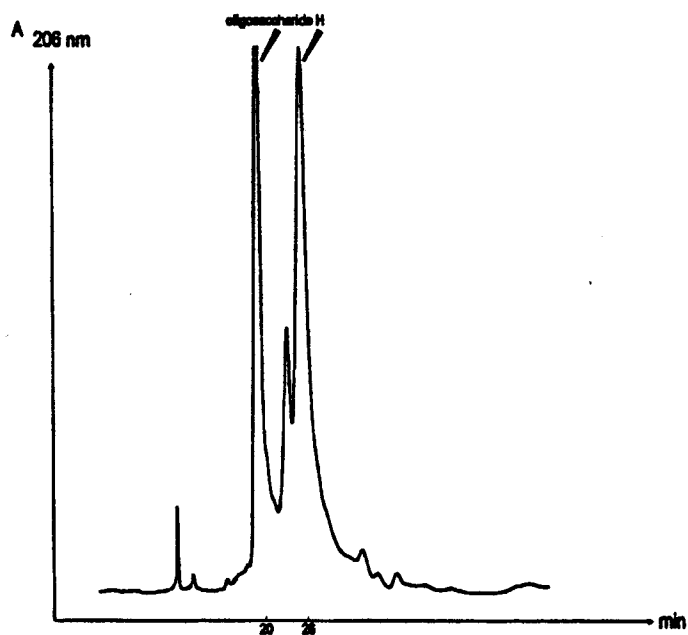
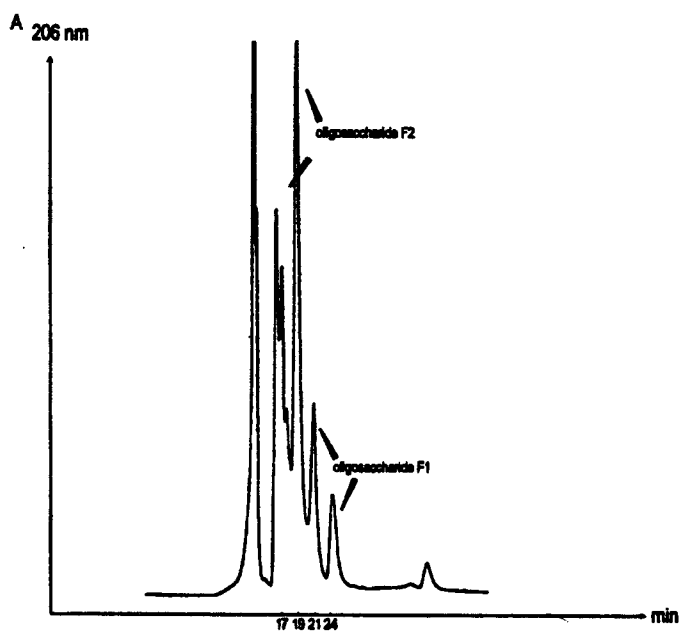


Figure 2. HPLC elution profiles of paper fractions F and H on LiChrosorb RP 18 column (250x10mm, particle size 7 μ m, Merck).

Table 1. Structures of the oligosaccharides released by non-reductive β -Elimination from human meconium mucins.

Gal(β 1-3)GalNAc	A
Gal(β 1-4)GalNAc	B
Fuc(α 1-2)Gal	C ₁
Gal(β 1-4)GlcNAc	C ₂
Gal(β 1-4)ManNAc	C ₃
GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-4)ManNAc	D
GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc	E ₁
Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc	E ₂
Gal(β 1-4)ManNAc /	F ₁
Fuc(α 1-3)	
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal /	F ₂
Fuc(α 1-3)	
GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-4)ManNAc /	G
Fuc(α 1-2)	
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc	H
GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc /	I
Fuc(α 1-2)	
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc /	J
Fuc(α 1-3)	
GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)GalNAc /	K
Fuc(α 1-2)	
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc /	L ₁
Fuc(α 1-3)	

Table 1 continued

Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc / Fuc(α 1-4)	L₂
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc / Fuc(α 1-3)	M₁
Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc / Fuc(α 1-4)	M₂

Oligosaccharide B.

The structure of oligosaccharide B was established by NMR spectrometry (Figure 4), which also allowed to establish the nature of the monosaccharide units. The doublets at $\delta = 5.184$ and 4.899 ppm were assigned to the anomeric proton of the α and β anomers, respectively, of N-acetylallosamine, according to the vicinal coupling constant pattern $J_{1,2}$, $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ which were defined using successive COSY, relayed and double relayed COSY spectra. The C-2 resonance, observed at $\delta = 53.81$ ppm, indicated the sugar to be N-acetylated at the C-2 proton. The two anomeric protons at $\delta = 4.730$ and 4.711 ppm were identified to those of a β -galactose unit, according to the J-connectivity data (table 2).

Fraction C.

The fraction C is a mixture of several disaccharides which were identified on the basis of the characterization of the H-1 atom resonances. The disaccharide Gal(β 1-4)GlcNAc constitutes the major compound of the mixture, as it can be clearly deduced from the occurrence of GlcNAc H-1 α and β atom resonance at $\delta = 5.207$ and 4.727 ppm, and Gal H-1 α and β at $\delta = 4.478$ and 4.474 ppm (Van Halbeek et al., 1983). A second isomer can be identified as Gal(β 1-4)ManNAc, on the basis of the anomeric protons observed at $\delta = 5.139$ (ManNAc α) and 5.037 ppm (ManNAc β). The anomeric proton of Gal(β 1-4) linked to ManNAc resonate at $\delta = 4.460$ ($\alpha\beta$) and 4.444 ppm ($\beta\beta$). The third compound contains α 1-2-linked Fuc (δ H-1 = 5.379 ppm, δ H-5 = 4.216 ppm, δ CH₃ = 1.212 ppm) and Gal (δ H-1 = 5.065 (α) and 4.654 ppm (β). NMR data for the three oligosaccharides are reported in table 3.

Oligosaccharide D.

Oligosaccharide D (Figure 5; Table 4) is a trisaccharide containing equal amounts of Gal (δ H-1 = 4.523 ppm ($\alpha\beta$), 4.506 ppm ($\beta\beta$), ManNAc (δ H-1 = 5.144 ppm (α), 5.044 ppm (β) and GlcNAc (δ H-1 = 4.862 ppm (α)). The sequence GlcNAc(α 1-4)Gal- β can be deduced from the significant H-4 atom resonance of Gal, identical to that observed in oligosaccharide E1 (see below). When compared with the data obtained for compound G, chemical shifts relative to ManNAc H-1, H-2 and H-3 point to a β -substitution. Therefore, the structure of oligosaccharide D was established to be : GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-4)ManNAc.

Oligosaccharide E₁.

The 2D COSY spectrum of oligosaccharide E₁ (Figure 6) shows the presence of two anomeric protons having the characteristic coupling constants of α -anomers. By measuring the $J_{2,3}$; $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ vicinal coupling constants, and according to the downfield shift of their H-2 resonances, the corresponding monosaccharide units were identified to α -GalNAc (δ H-1 = 5.210 ppm) and α -GlcNAc (δ H-1 = 4.871 ppm). The two doublets at δ = 4.540 and δ = 4.533 ppm correspond to the anomeric protons of the same β -Gal unit attached to α and β terminal reducing sugar. The ¹H and ¹³C COSY spectrum indicates the ¹³C-3 atom resonance of GalNAc and ¹³C-4 atom resonance of Gal to be deshielded at δ = 73.25 and 77.90 ppm, respectively, whereas the ¹³C atom resonance of GlcNAc are characteristic of a terminal non-reducing carbohydrate unit (Table 2). These results are indicative of the sequence GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc.

Oligosaccharide E₂.

The 1D NMR spectrum of oligosaccharide E₂ shows the anomeric protons of the α -anomer (δ = 4.716 ppm) of terminal reducing N-acetylglucosamine. Two others H-1 atom resonance can be assigned to Fuc at δ = 5.313 ppm (α); 5.307 (β) and to Gal at δ H-1 = 4.546 ppm (α); δ H-1 = 4.541 ppm (β). The set of CH₃ and H-5 resonances of the Fuc residue is characteristic of an α -1,2-linked sugar unit (Table 5). On the basis of these observations, oligosaccharide E₂ was identified as Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc.

Oligosaccharide F₁.

The oligosaccharide F₁ exhibits anomeric proton resonances at δ = 5.195 (α) and 5.020 (β) ppm which are characteristic of the ManNAc sugar unit when compared with authentic ManNAc standard (Figure 5). The other H-1 resonances were attributed to Fuc (4.969; 5.004 ppm) and Gal (4.466; 4.454 ppm). The H-5 atom of the α -1,3-linked fucose is upfield shifted at δ = 4.582 ppm (Table 4), in regard with reference Le^X determinant (δ H-5 = 4.8 ppm). The structure of oligosaccharide F₁ was defined to Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]ManNAc.

Oligosaccharide F₂.

Oligosaccharide F₂ contains 2 Gal, 1 Fuc and 1 GlcNAc residues. The set of H-1, H-5 and H-6 atom resonances observed at 5.100, 4.835 and 1.179 ppm is characteristic of an α -1,3-linked Fuc residue (Le^X determinant). The terminal reducing Gal residue (δ H-1 = 5.110 (α anomer), δ H-1 = 4.456 ppm(β

anomer) possess an H-4 resonance deshielded at 4.151 (α) and 4.169 ppm (β), and is consequently O-3 substituted (Table 6). According to these observations the oligosaccharide F₂ was established to be : Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal.

Oligosaccharide G.

Oligosaccharide G is composed of 1 Fuc, 1 Gal, 1 GalNAc and 1 ManNAc units, according to the examination of its 2D COSY spectrum. ManNAc was identified by comparison with the 1D-NMR spectrum of pure ManNAc, which exhibits two identical $J_{1,2}$ vicinal coupling constants for α and β -anomers. Moreover, the pattern of the vicinal coupling constants, particularly $J_{3,4}$ and $J_{4,5}$, confirms the identification of the reducing carbohydrate unit as ManNAc. The NMR parameters found for the α -Fuc and α -GalNAc, together with the deshielded chemical shift of β -Gal residue are characteristic of the blood-group A determinant (Strecker et al.,1989). The H-4 resonance of the α -ManNAc is downfield shifted to 3.946 ppm, that is indicative of a C-4 substitution (Table 7). On the basis of these results, the structure of oligosaccharide G was established to be : GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-4)ManNAc.

Oligosaccharide H.

Oligosaccharide H (Table 2) contains 1 Gal, 1 GlcNAc and 1 GalNAc unit, as inferred by the examination of its 2D COSY spectrum (Figure 7). GalNAc occurs in terminal reducing position, as shown by the doubling of its anomeric proton at δ H-1 = 5.206 ppm (α -anomer) and δ H-1 = 4.616 ppm(β -anomer). The H-2, H-3 and H-3 atom resonances of Gal possess the typical chemical shifts of a terminal non reducing Gal unit, whereas the downfield value observed for GlcNAc H-4 resonance confirms its C-4 substitution. The respective downfield and upshift effects affecting at H-6 and H-6' atom resonances of the GalNAc unit is an indication of its substitution at C-6 by N-acetylglucosamine. According to these observations, the oligosaccharide H was identified as : Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc.

Oligosaccharide I.

The 2D-COSY spectrum of oligosaccharide I shows the presence of α -GalNAc; α,β -GlcNAc; β -Gal and α -Fuc in the ratio 1:1:1:1 (Figure 8). The H-1 resonances of α -Fuc and β -Gal are doubled by the anomeric effect due to the α and β forms of reducing GlcNAc. The NMR data (Table 8) relative to Fuc, GalNAc and Gal clearly indicate the presence of blood-group A determinant (Strecker et al.,1989),

whereas the deshielded H-4 resonance β -GlcNAc is significant of an C-4 substitution of this sugar unit. Consequently, the structure of oligosaccharide I was established to be: GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-4)GlcNAc.

Oligosaccharide J.

The NMR spectrum of compound J (Figure 9; Table 6) shows the characteristic features of a Lewis x determinant containing oligosaccharide, as indicated by the chemical shift of the Fuc structural-reporter groups. GalNAc occurs at terminal reducing position (δ H-1(α) = 5.207 ppm, δ H-2(α) = 4.177 ppm), and the downfield shift observed for its H-5 resonance (δ H-5 = 4.172 ppm) is significant of an C-6 substitution. Therefore, the structure of the oligosaccharide J was established to be the following tetrasaccharide: Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-6)GalNAc.

Oligosaccharide K.

The oligosaccharide K (Figure 9) possess a GalNAc at the reducing end, as showed by the H-1 resonances observed at δ = 5.204 ppm (α -anomer) and δ = 4.700 ppm (β -anomer) and already defined for compound E1. The set of H-1, H-5 and H-6 resonance of Fuc as well as the H-1 and H-4 resonance of Gal III and GalNAc IV is characteristic of blood-group A trisaccharide determinants. The GlcNAc residue (δ H-1 = 4.449 ppm (β), 4.445 ppm (α), δ NAc = 2.059 ppm) is attached at the C-3 position of GalNAc, according to the downfield shifted value observed for the H-4 atom resonance of the terminal reducing GalNAc residue (Table 6). According to these observations, the oligosaccharide K was defined to be GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)GalNAc.

Oligosaccharide L₁.

The anomeric protons observed at δ = 5.231 (α) and 5.056 (β) ppm present the same coupling constants (Figure 10) than those observed for the TalNAc residue in compound A. Two Gal residues (δ H-1 = 4.704 and 4.461 ppm) are present in the molecule, one of which being substituted at the C-3 position, as indicated by the downfield shift of its H-4 resonance (δ H-4 = 4.169 ppm). The set of the H-1, H-5 and H-6 atom resonance of Fuc are characteristic of an α -1,3 linked fucose residue (Table 9). Based upon these observations, the oligosaccharide L₁ was described as: Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-3)TalNAc.

Oligosaccharide L₂.

The NMR spectrum of oligosaccharide L₂ (Figure 10) is very similar to that of oligosaccharide L₁, with slight differences concerning the set of H-1, H-5 and H-6 atom resonances of fucose residue, which is typical of α -1,4 linked fucose residue, and the H-1 atom resonance of Gal IV (Table 9). Consequently, its structure was defined to be: Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc.

Fraction M.

The 2D-COSY spectrum of oligosaccharides M₁ and M₂ indicates the presence of β -Gal, β -GlcNAc and α -Fuc. The set of Gal H-2, H-3 and H-4 atom resonances shows three type of Gal units engaged in three types of sequences. The two anomeric protons of α -Fuc, at $\delta = 5.128$ and 5.026 ppm, respectively, and characteristic of α -1,3 and α -1,4-linked fucoses (Le^X and Le^a determinants). Considering that the integration of the Gal H-1 resonances gives two signals in the ratio 1:3, and the fact that the H-4 signal at $\delta = 4.156$ ppm possess the intensity of two protons, the fraction M can be considered as the mixture of two oligosaccharides with the same reducing terminal Gal β 1-4GlcNAc unit, and differing from the non reducing terminal trisaccharide which display Le^X or Le^a activity. The Gal II residue is C-3 substituted, as confirmed by the downfield shifted value of the H-4 resonance (Table 10). According to these observations, we concluded that the fraction M contains the two following oligosaccharides: M₁ = Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc and M₂ = Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc.

Synthesis of neoglycolipids

In order to confirm that the described β -Elimination procedure produces oligosaccharides which may be directly employed in the synthesis of neoglycoconjugates such as neoglycolipids, oligosaccharides were condensed to alkylniline derivatives by the reductive-amination method and were analysed by TLC. Since the antigenic epitopes beared by the oligosaccharides are not engaged in the linkage with the lipid, the synthesized neoglycolipids may be used for different immunoassays such as antibodies or lectin binding. Figure 11 illustrates the TLC profiles obtained for compound C, demonstrating the heterogeneity of the fraction.

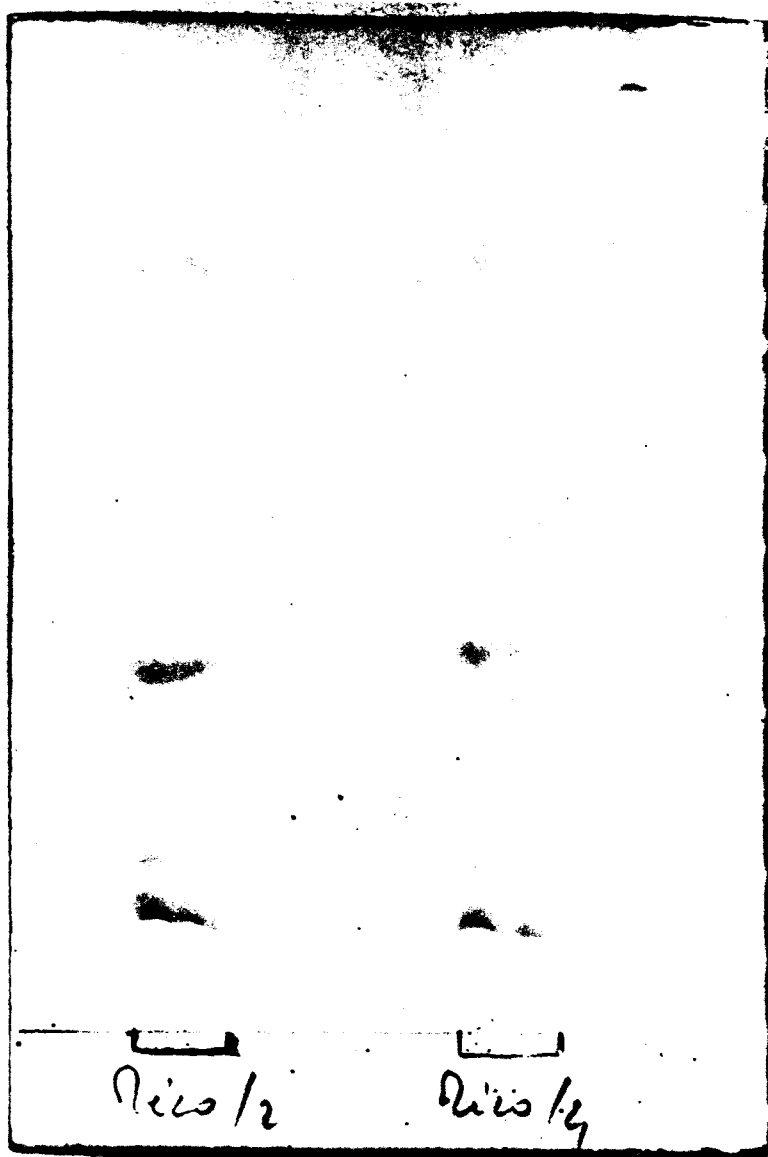


Figure 11. Thin layer chromatography of neoglycolipids formed from oligosaccharides C.

Solvent system was: chloroforme/methanol/water (130/50/9, by vol.).



DISCUSSION

O-linked glycans are classically released from mucins by reductive alkaline treatment according to the figure 12. In non reducing conditions, the carbohydrate chain may be partially modified leading to the formation of Kuhn's chromogens. Moreover, oligosaccharides released during the non-reductive β -Elimination differ in their reducing terminal monosaccharides. GalNAc which normally constitutes the terminal reducing sugar may be replaced respectively by TalNAc, AllNAc, ManNAc, Gal or GlcNAc. These different monosaccharides originate either from epimerization or peeling reactions according to the figure 13. In all cases the terminal monosaccharide which may be directly conjugate to the NH_2 group of protein or lipid carriers for "neoglycoconjugates" synthesis. In regard of their structures it should be mentioned that most of oligosaccharides released from meconium means express antigenic epitopes. Some of them are related to classical blood group substances such as the A (oligosaccharides G, I and K), H (oligosaccharides C_1 and E_2) or Lewis^a (oligosaccharides L_2 and M_2) antigens. The most qualitatively abundant antigen appears to be the Lewis^x (SSEA-1) determinant (Solter & Knowles, 1978; Gooi et al., 1981) which is beared by oligosaccharides F_1 , F_2 , J, L_1 and M_1 . In this respect, human meconium mucins appears as an appreciable source of the large-scale preparation of this antigen. Oligosaccharides D and E_1 express the $\text{GlcNAc}(\alpha 1-4)\text{Gal}$ epitope, which has been previously described in human meconium by Hounsell et al. (1989) and in porcine gastric mucin (Van Halbeek et al., 1982). This antigen appears to be characteristic of the gastro-intestinal tract mucins. Oligosaccharides H and J possess the mucin core type 6 $\text{GlcNAc}(\beta 1-6)\text{GalNAc}$. Such structures have been reported only in human glycoproteins: ovarian cyst glycoproteins (Wu et al., 1982 and 1984; Mutsaers et al., 1986), κ -casein (Van Halbeek et al., 1985; Saito et al., 1988) and meconium (Hounsell et al., 1985 and 1988), suggesting that human tissues may contain a $\beta 6$ -GlcNAc-transferase which acts directly on $\text{GalNAc}-\alpha\text{-Ser/Thr}$ and does not obey the three-before-six rule (i.e., does not required the prior synthesis of the $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$ - or $\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$ - sequence) (Schachter & Brockhausen, 1992). An activity synthezing the $\text{GlcNAc}(\beta 1-6)\text{GalNAc}$ - linkage, and not requiring prior 3-substitution of GalNAc-R , has been reported in human ovarian tissue (Yazawa et al., 1986). It should be mentioned that all of the oligosaccharides described in this study represents lower mass isomers structures, larger structures are eluted from the charcoal column with concentrated ethanol solutions (15%, by vol.) (see figure 1) and are presently under investigation.

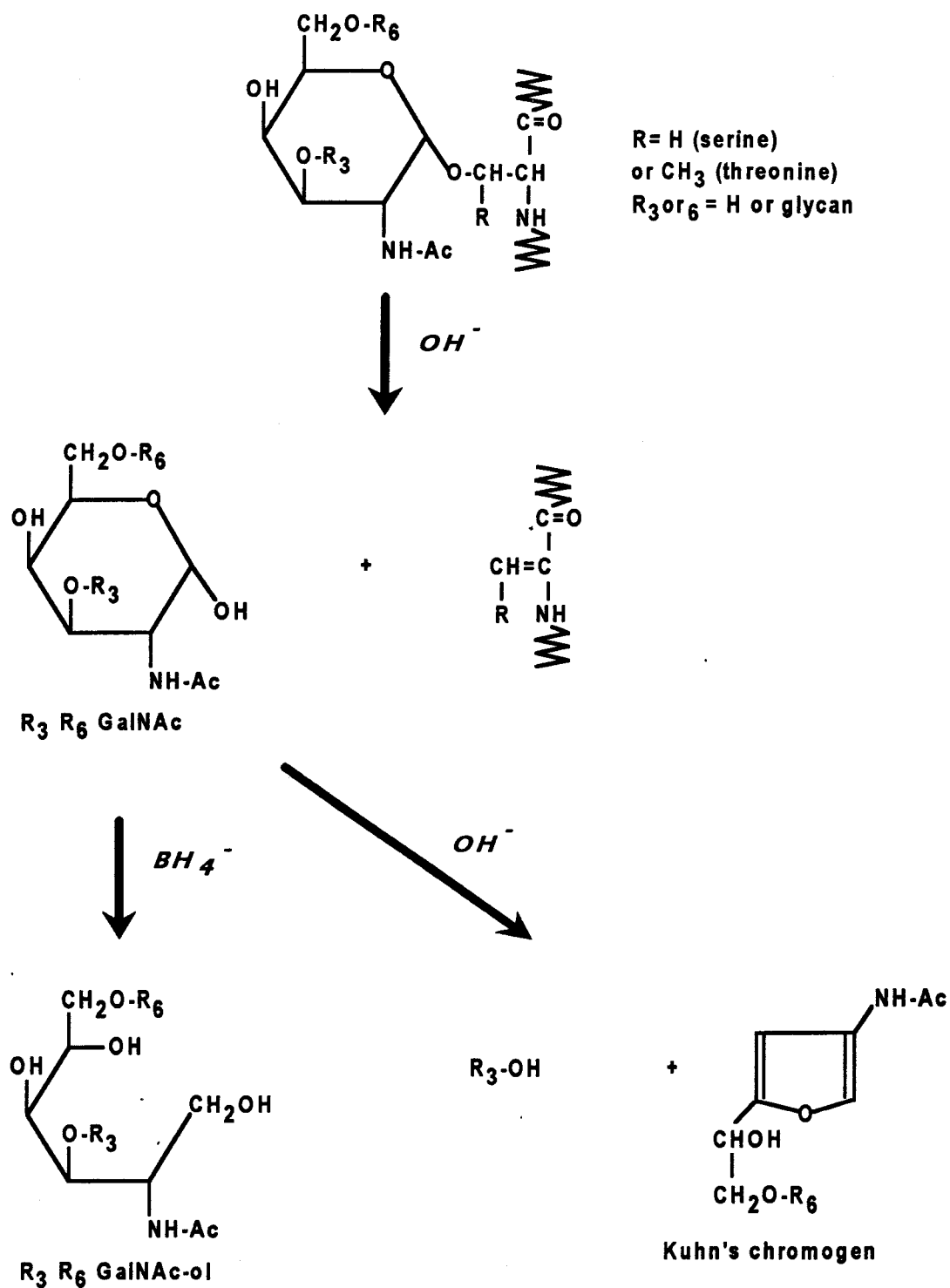


Figure 12. Effects of alkali and alkaline borohydride on the O-glycosidic linkage in mucins.



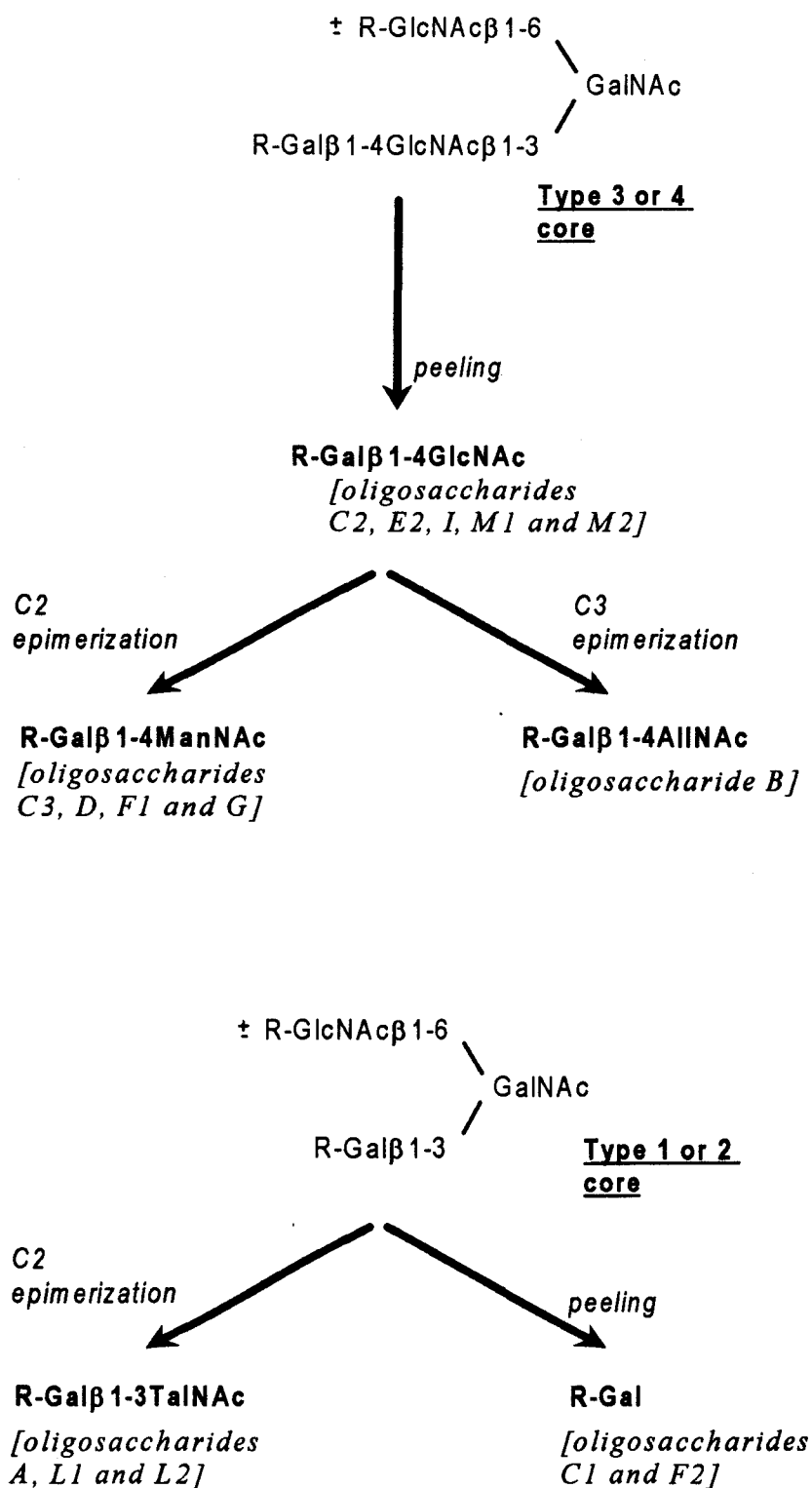


Figure 13. Reactions occurring during non-reductive β -Elimination leading to different reducing monosaccharides.

REFERENCES

- Feizi, T. & Childs, R.A. (1985) *Trends. Biochem. Sci.* 10, 24-29.
- Feizi, T. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 930-934.
- Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D. & Evans, M.J. (1981) *Nature* 292, 156-158.
- Gooi, H.C. & Feizi, T. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 539-545.
- Gooi, H.C., Uemura, K., Edwards, P.A.W., Foster, C.S., Pickering, N.J. & Feizi, T. (1983) *Carbohydr. Res.* 120, 293-302.
- Gray, G.R. (1978) *Methods in enzymology* 50, 155-160.
- Herlant-Peers, M.C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G.A. & Vliegthart, J.F.G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M., Lui, S.C. & Feizi, T. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 367-377.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Cashmore, G.C., Kane, D.P., Stoll, M. & Feizi, T. (1988) *Biochem. J.* 256, 397-401.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M.S., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A., Feeney, J. & Feizi, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* 186, 597-610.
- Iyer, R.N. & Carlson, D.M. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 101-105.
- Mutsaers, J.H.G.M., Van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G., Wu, A.M. & Kabat, E.A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 139-146.
- Partridge, S.M. (1950) *Biochem. Soc. Symp.* 3, 52-61
- Ramphal, R., Carnoy, C., Fievre, S., Michalski, J.C., Houdret, N., Lamblin, G., Strecker, G. and Roussel, P. (1991) *Infect. Immun.* 59, 700-704.
- Saito, T., Itoh, T. & Adachi, S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 964, 213-220.
- Schachter, H. & Brockhausen, I. (1992) in *Glycoconjugates: composition, structure, and function* (Allen, H.J. & Kisailius, E.C., Eds.) pp 263-332, Marcel Dekker Inc., New York.
- Solter, D. & Knowles, B.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5565-5569.
- Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C. & Montreuil, J. (1989) *Glycoconjugate J.* 6, 271-284.
- Svennerholm, L. & Fredman, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 617, 97-109.

- Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J.F.G., Kochetkov, N.K., Arbatsky, N.P. & Derevitskaya, V.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 21-29.
- Van Halbeek, H. & Vliegthart, J.F.G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 124-131.
- Van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G., Fiat, A. Jolles, P. (1985) *FEBS Lett.* 187, 81-88.
- Wu, A.M., Kabat, E.A., Pereira, M.E.A., Gruezo, F.G. & Liao, J. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 390-404.
- Wu, A.M., Kabat, E.A., Nilsson, B., Zopf, D.A., Gruezo, F.G. & Liao, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7178-7186.
- Yazawa, S., Abbas, S.A., Madiyalakan, R., Barlow, J.J. & Matta, K.L. (1986) *Carbohydr. Res.* 120, 241-252.

Acknowledgements: This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111: Relation structure-fonction des constituants membranaires; director: Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandre-Artois and by the Ministère de l'Education Nationale. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR apparatus.



Table 2. ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts of the oligosaccharides *A*, *B*, *E1* and *H*. nd = not determined

sugar	δ of															
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
ppm																
oligosaccharide A																
Gal(β 1-3)	4.702 (α)	3.460 (α)	3.870 (α)	3.983 (α)	3.796 (α)	3.77 (α)			94.66 (α)	79.27 (α)	71.10 (α)	70.38 (α)	78.51 (α)	62.07		
	4.713 (β)	3.414 (β)	3.918 (β)	3.992 (β)	nd	nd			94.82 (β)	79.47 (β)	70.95 (β)	70.32 (β)	78.42 (β)			
TalNAc α	5.241	4.241	4.112	4.118	4.434	3.834		2.066	92.56	53.65	75.40	69.58	72.06	61.65	176.07	23.15
β	5.058	4.186	4.087	3.889	nd	nd		2.023	93.22	53.12	74.76	70.32	76.29	61.51	nd	23.08
oligosaccharide B																
Gal(β 1-4)	4.730 (α)	3.383 (α)	3.977 (α)	3.996	3.80 (α)	3.82	3.73		94.82 (α)	79.39 (α)	71.13 (α)	70.28 (α)	78.42 (α)	62.05		
	4.711 (β)	3.426 (β)	3.918 (β)		3.81 (β)				94.70 (β)	79.00 (β)	71.30 (β)	70.33 (β)	78.56 (β)			
AllNAc α	5.184	4.162	4.247	4.084	4.596	3.93	3.83	2.057	90.83	50.73	74.71	71.34	64.14			
β	4.899	4.007	4.199	4.075	4.422	3.918	3.786	2.046	94.64	53.81	75.57	71.89	71.72			
oligosaccharide E1																
GlcNAc(α 1-4)	4.871	3.916	3.789	3.543	4.185	3.836	3.774	2.072	99.49	55.24	71.81	70.96	73.32	61.35	175.60	23.17
Gal(β 1-3)	4.540 (α)	3.598 (α)	3.750 (α)	3.992	3.779	3.764	3.662		104.58	72.12	73.25	77.90 (α)	76.97	61.60		
	4.533 (β)	3.578 (β)	3.735 (β)									77.96 (β)				
GalNAc α	5.210	3.912	3.746	3.899	3.928	3.900	3.800	2.047	91.90	55.15	80.42	70.70	71.65	61.31	175.78	23.23
β	4.737	3.717	3.732	3.709	3.600	nd	nd	2.044	96.13	57.79	80.01	73.86	76.22	61.42	176.05	23.51
oligosaccharide H																
Gal(β 1-4)	4.471	3.540	3.667	3.927	3.700	nd	nd		104.21	72.28	73.84	69.87	76.69	62.32		
GlcNAc(β 1-6)	4.591 (α)	3.744	3.774	3.713	3.601	4.020	3.836	2.038	102.79 (α)	56.32	73.65	79.80	76.07	61.38	176.01	23.49
	4.596 (β)								102.91 (β)							
GalNAc α	5.206	4.119	3.902	3.958	4.183	4.003	3.779	2.044	92.35	51.56	68.56	69.81	70.47	70.53	176.01	23.27
β	4.616	3.854	3.700	3.902	nd	nd	nd	nd	96.72	55.05	72.28	69.12	75.14	70.42	176.01	23.49

Table 3. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharides *C1*, *C2* and *C3*.

sugar	δ of						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NAc
ppm							
oligosaccharide C1							
Fuc(α 1-2)	5.379 (α)	3.762	3.994	3.828	4.216 (α)	1.212 (α)	
	5.182 (β)				4.315 (β)	1.186 (β)	
Gal α	5.065	3.784	3.906	4.020	4.112	3.73	
β	4.654	3.525	3.828	3.906	nd	nd	
oligosaccharide C2							
Gal(β 1-4)	4.478 (α)	3.552 (α)	3.678	3.928	3.725	3.81 (α)	
	4.474 (β)	3.543 (β)				3.70 (β)	
GlcNAc α	5.207	3.902	3.73	3.98	nd	nd	2.043
β	4.727	3.72	3.72	3.72	nd	3.936	2.041
						3.830	
oligosaccharide C3							
Gal(β 1-4)	4.444 (α)	3.55	3.68	3.98	3.725	3.81	
	4.460 (β)					3.70	
ManNAc α	5.139	4.346	4.162	3.968	nd	nd	2.085
β	5.037	4.498	3.955		3.72	nd	2.085

nd = not determined

Table 4. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharides *D* and *F1*.

Residue		δ in	
		D	F1
		ppm	
GlcNAc(α 1-4)	H-1	4.862	
	H-5	4.19	
	NAc	2.073	
Gal(β 1-4)	H-1	4.523 (α)	4.466 (α)
		4.506 (β)	4.454 (β)
	H-2		3.482 (α)
			3.452 (β)
H-4	3.998	3.905	
Fuc(α 1-3)	H-1		4.969 (α)
			5.004 (β)
	H-5		4.582 (α)
			4.626 (β)
CH ₃		1.202 (α)	
			1.189 (β)
ManNAc α	H-1	5.144	5.195
	H-2	4.348	4.409
	H-3	nd	4.201
	NAc	2.047	2.030
ManNAc β	H-1	5.044	5.020
	H-2	4.507	4.638
	NAc	nd	2.066

nd = not determined

Table 5. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharide *E2*.

sugar	δ of						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NAc
ppm							
Fuc(α 1-2)	5.313 (α)	3.816	3.792	3.820	4.244 (α)	1.228 (α)	
	5.307 (β)				4.220 (β)	1.224 (β)	
Gal(β 1-4)	4.546 (α)	3.670	3.882	3.899	nd	nd	
	4.541 (β)						
GlcNAc α	5.212	3.930	3.860	3.799	3.870	3.670	2.048
	β 4.716	3.728	3.655	3.790	3.483	3.957	2.045
						3.798	

nd = not determined

Table 6. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharides *F2*, *J* and *K*.

Residue		δ in		
		F2	J	K
		ppm		
Gal(β 1-4)	H-1	4.467	4.451	4.621(α) 4.626 (β)
	H-2	3.506	3.494	
	H-3			4.015
	H-4	3.900	nd	4.214
Fuc (α 1-3)	H-1	5.100	5.112	
	H-5	4.835	4.822	
	CH ₃	1.174 (α) 1.179 (β)	1.174	
GlcNAc(β 1-3)	H-1	4.733		4.445 (α) 4.449 (β)
	NAc	2.033		2.059
GlcNAc(β 1-6)	H-1		4.600	
	NAc		2.043	
GalNAc(α 1-3)	H-1			5.180
	H-2			4.214
	H-4			3.98
	H-5			4.297
	NAc			2.038
Fuc(α 1-2)	H-1			5.248
	H-5			4.347
	CH ₃			1.245
GalNAc α	H-1		5.207	5.204
	H-2		4.117	
	H-5		4.172	
	NAc		2.032	2.040
GalNAc β	H-1		4.615	4.700
	NAc		2.030	2.038
Gal α	H-1	5.110		
	H-4	4.151		
	H-5	3.999		
Gal β	H-1	4.456		
	H-2	3.496		
	H-4	4.169		

nd = not determined

Table 7. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharide *G*.

sugar	δ of							
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc
	ppm							
Fuc(α 1-2)	5.347 (α)	3.801	3.708	3.830	4.379 (α)	1.249 (α)		
	5.357 (β)				4.322 (β)	1.242 (β)		
GalNAc(α 1-3)	5.176	4.240	3.897	4.000	4.210	3.800	3.750	2.041
Gal(β 1-4)	4.608 (α)	3.906	3.990	4.225	nd	nd	nd	
	4.592 (β)							
ManNAc α	5.140	4.344	4.121	3.946	nd	nd	nd	2.046
	β 5.013	4.507	3.911	nd	3.440	3.960	3.840	2.038

nd = not determined

Table 8. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharide *I*.

sugar	δ of							
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc
	ppm							
Fuc(α 1-2)	5.353 (α)	3.796	3.722	3.836 (α)	4.352 (α)	1.249 (α)		
	5.347 (β)			3.827 (β)	4.314 (β)	1.242 (β)		
GalNAc(α 1-3)	5.179	4.244	3.902	3.998	4.209	3.802	3.574	2.042
Gal(β 1-4)	4.604 (α)	3.911(α)	3.990	4.222	3.650	3.800	3.760	
	4.600 (β)	3.902 (β)						
GalNAc α	5.212	3.937	3.849	nd	nd	nd	nd	2.050
	β 4.717	3.722	3.647	3.796	3.469	3.963	3.792	2.046

nd = not determined

Table 9. ¹H-NMR chemical shifts of the oligosaccharides *L1* and *L2*.

Residue	δ in		
	L1	L2	
ppm			
IV Gal(β 1-4)	H-1	4.462	
	H-4	3.886	
IV Gal(β 1-3)	H-1		4.544
	H-4		3.885
Fuc(α 1-3)	H-1	5.151	
	H-5	4.830	
	CH ₃	1.177	
Fuc(α 1-4)	H-1		5.024
	H-5		4.872
	CH ₃		1.182
III GlcNAc(β 1-3)	H-1	4.773 (α)	4.752 (α)
		4.786 (β)	4.788 (β)
	NAc	2.083 (α)	2.094 (α)
		2.088 (β)	2.083 (β)
II Gal(β 1-3)	H-1	4.704	4.703
	H-4	4.169	4.163
I TalNAc α	H-1	5.231	5.230
	H-2	4.286	4.309
	H-3	4.08	4.08
	H-4	4.12	4.12
	H-5	4.444	4.444
	NAc	2.060	2.061
	TalNAc β	H-1	5.056
	H-2	4.219	4.220
	H-3	4.07	4.07
	NAc	2.017	2.020

nd = not determined

Table 10. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharides *M1* and *M2*.

sugar	δ of							
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc
ppm								
oligosaccharide M1								
Gal(β 1-4)	4.459	3.494	3.652	3.897	nd	nd		
Fuc(α 1-3)	5.128	3.691	3.906	3.792	4.829	1.175		
GlcNAc(β 1-3)	4.710	3.954	3.915	nd	3.60	3.97		
						3.72		
Gal(β 1-4)	4.462	3.577	3.731	4.156	nd	nd		
GlcNAc α	5.205	3.893	3.717	3.72	nd	nd		2.041
β	4.715	3.700	3.70	nd	nd	nd		
oligosaccharide M2								
Gal(β 1-3)	4.506	3.485	3.621	3.884	nd	nd		
Fuc(α 1-4)	5.026	3.801	3.889	3.792	4.866	1.180		
GlcNAc(β 1-3)	4.703	3.946	4.083	3.757	3.542	3.93		
						3.72		
Gal(β 1-4)	4.462	3.594	3.713	4.156	nd	nd		
GlcNAc α	5.205	3.893	3.717	3.72	nd	nd		2.041
β	4.715	3.700	3.70	nd	nd	nd		

nd = not determined

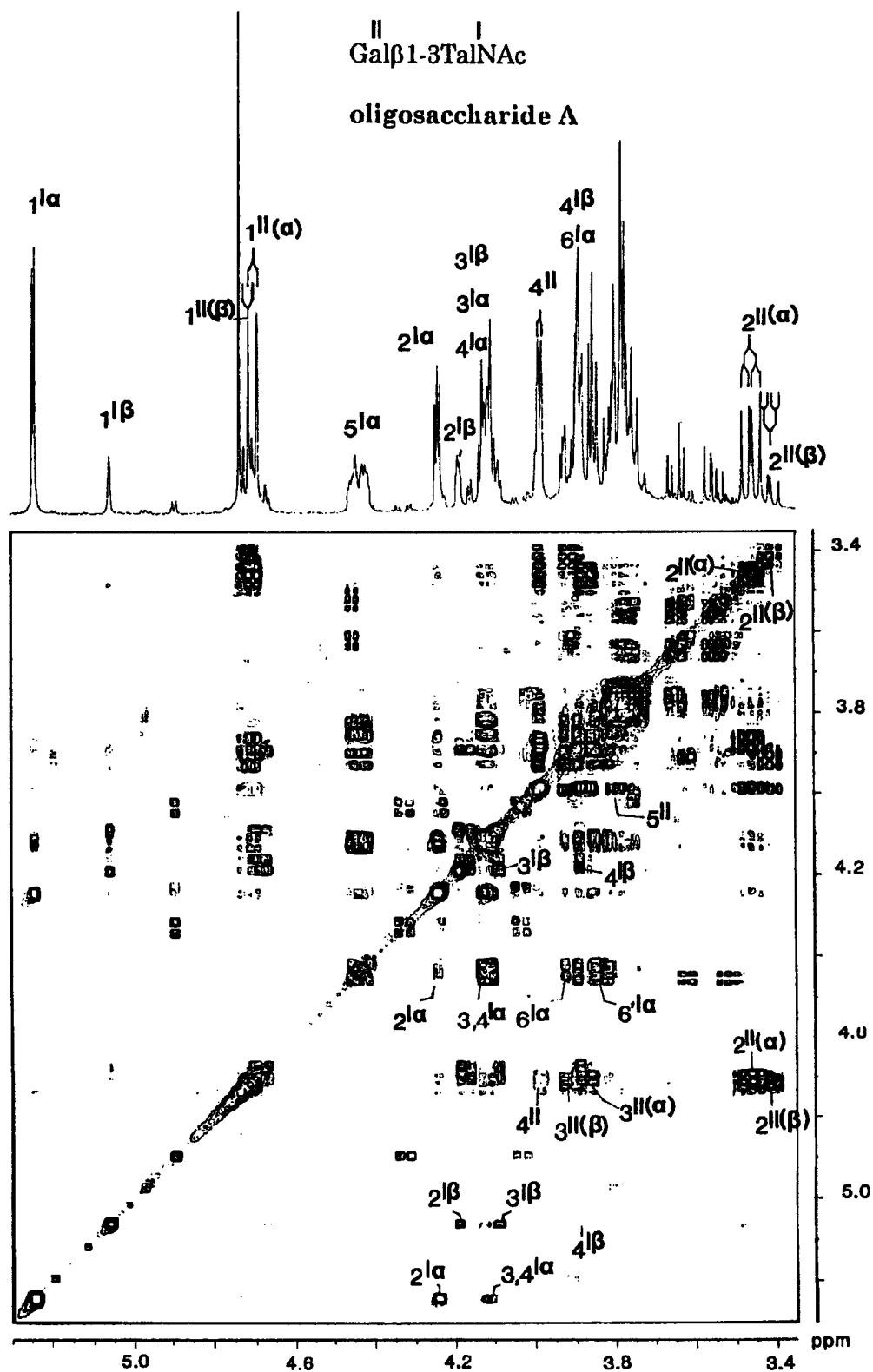


Figure 3. Double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide A.

1^I , 2^I indicate the chemical shifts of H-1, H-2 of sugar I.



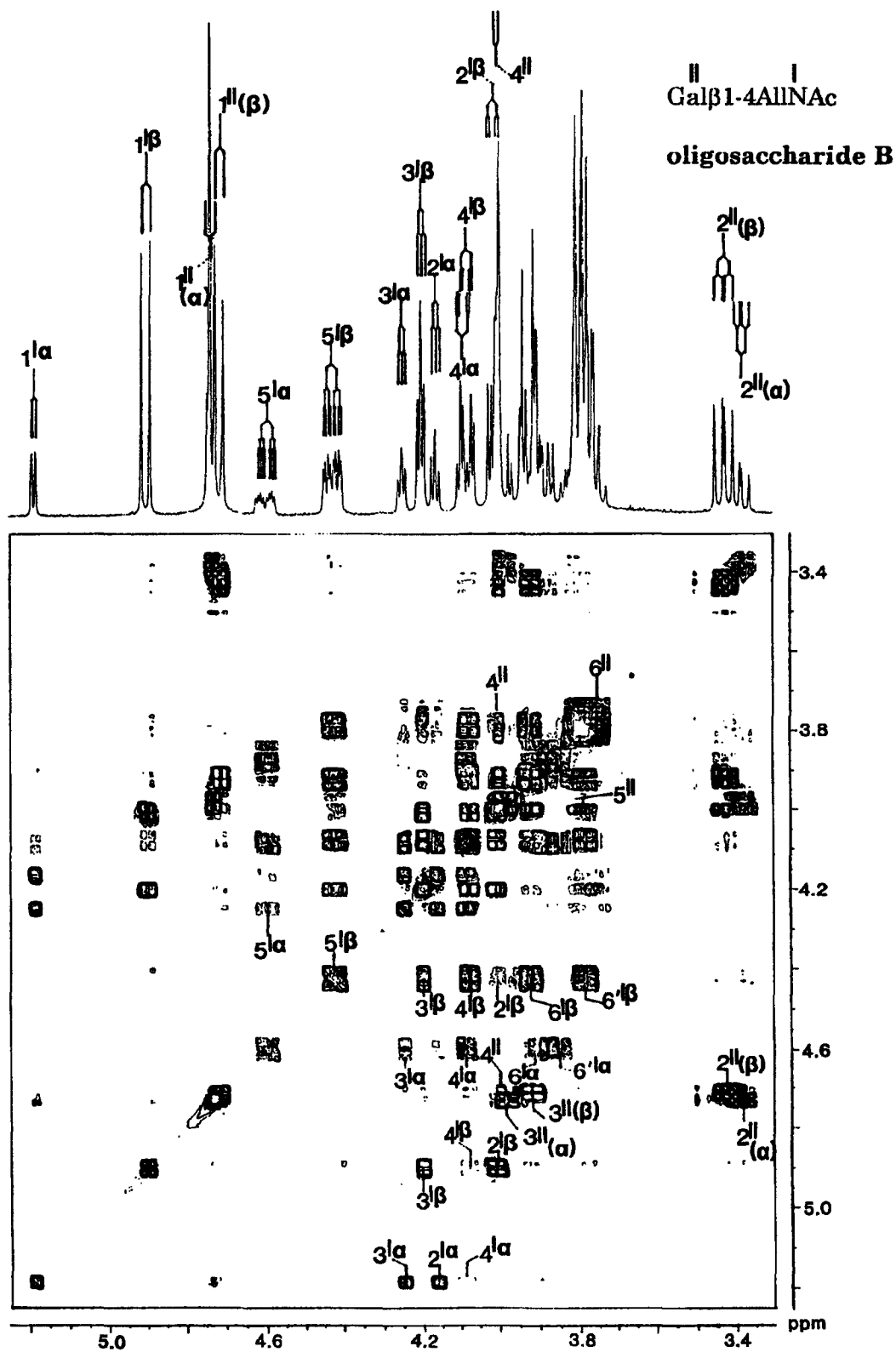


Figure 4. Double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide B.

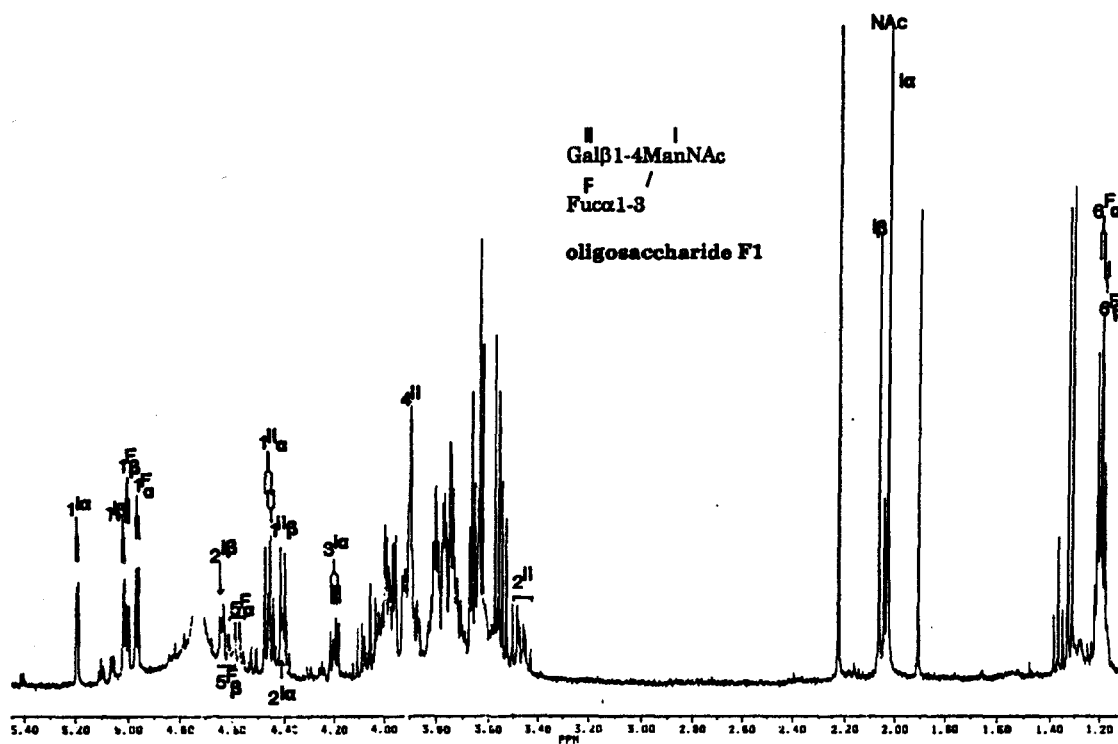
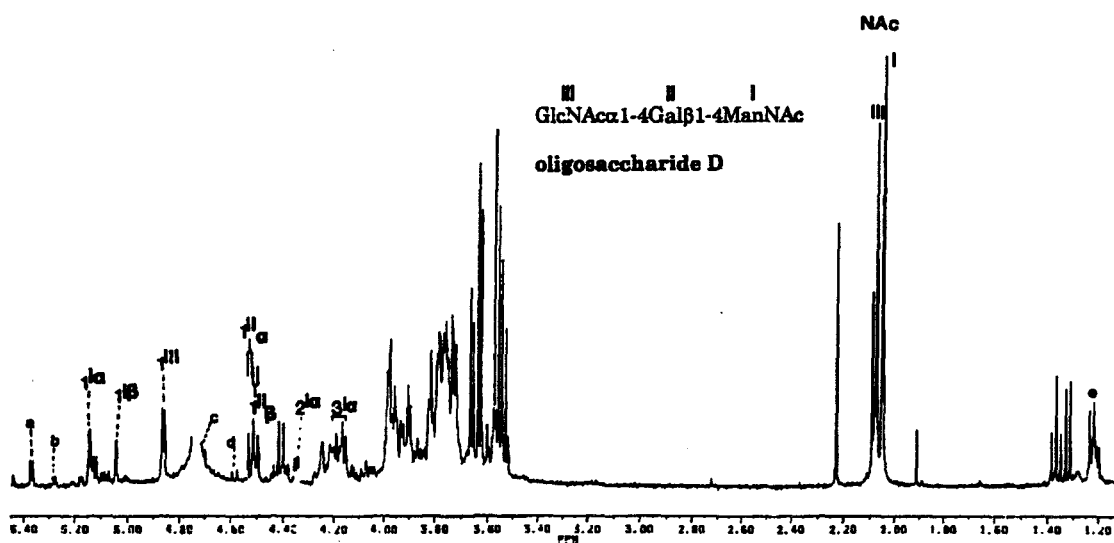


Figure 5. $^1\text{H-NMR}$ spectra of oligosaccharides D and F1.

(a, b, c, d, e signals corresponding to Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GalNAc contaminant)



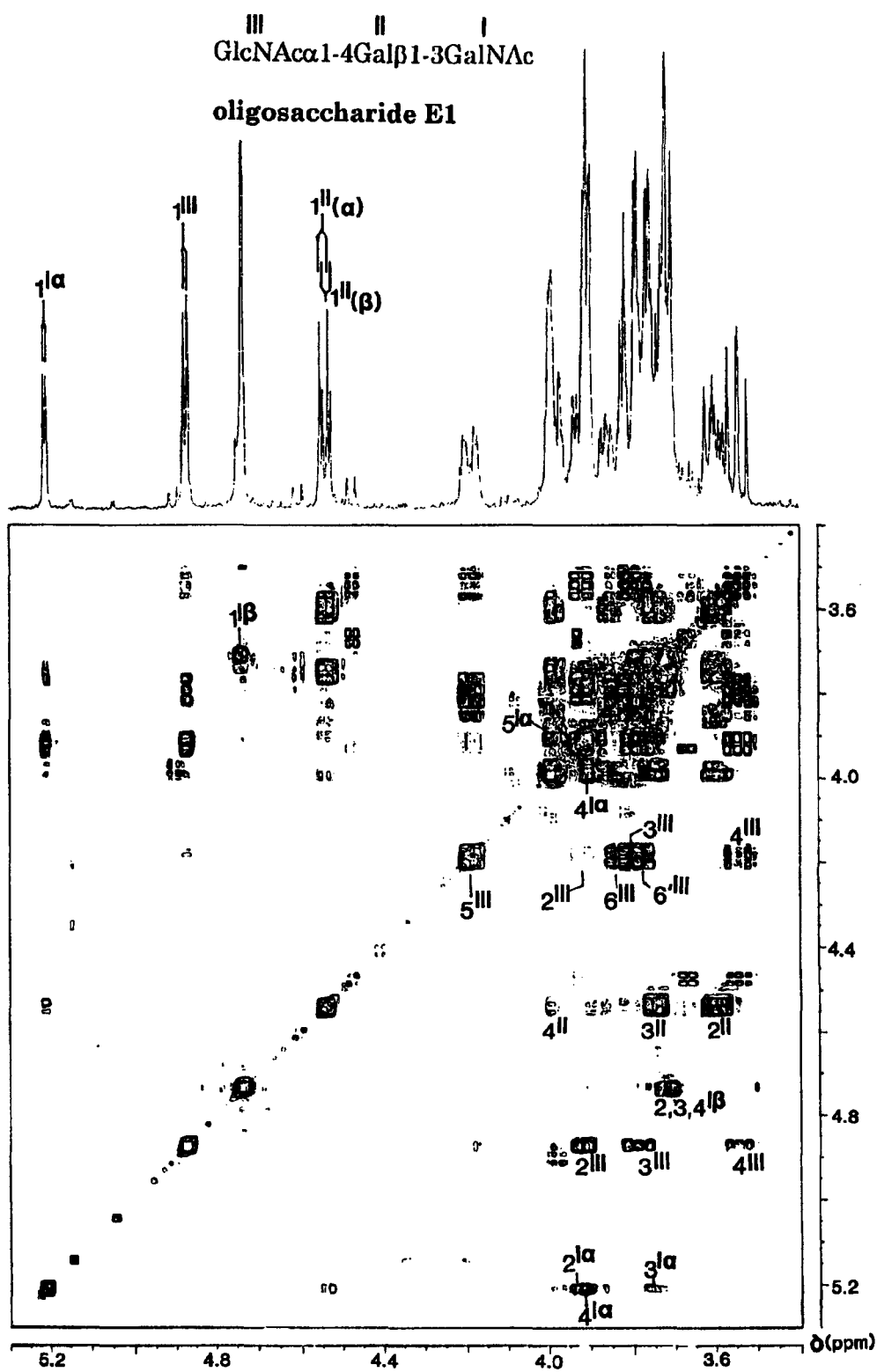


Figure 6. Double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide E1.

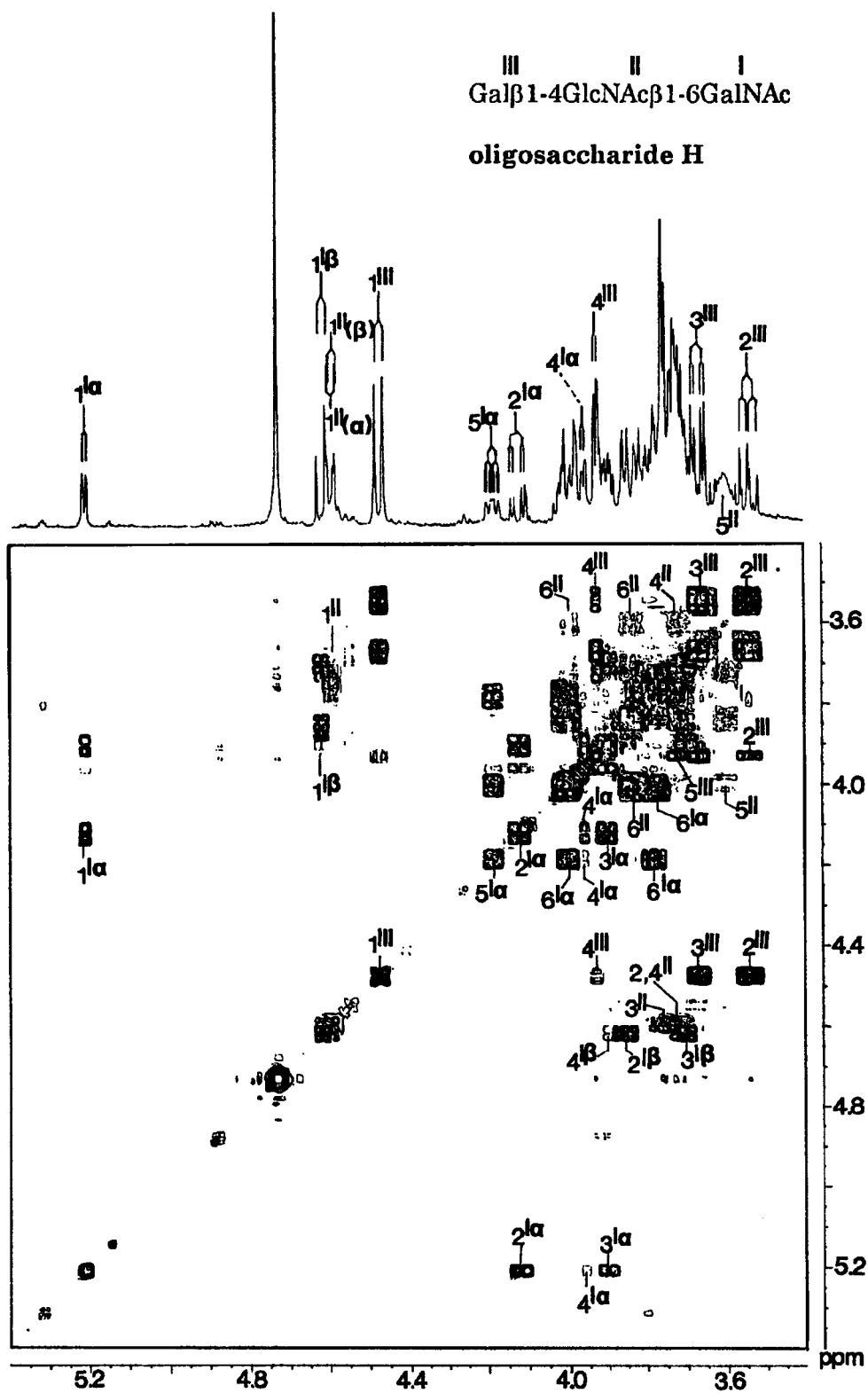


Figure 7. Double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide H.

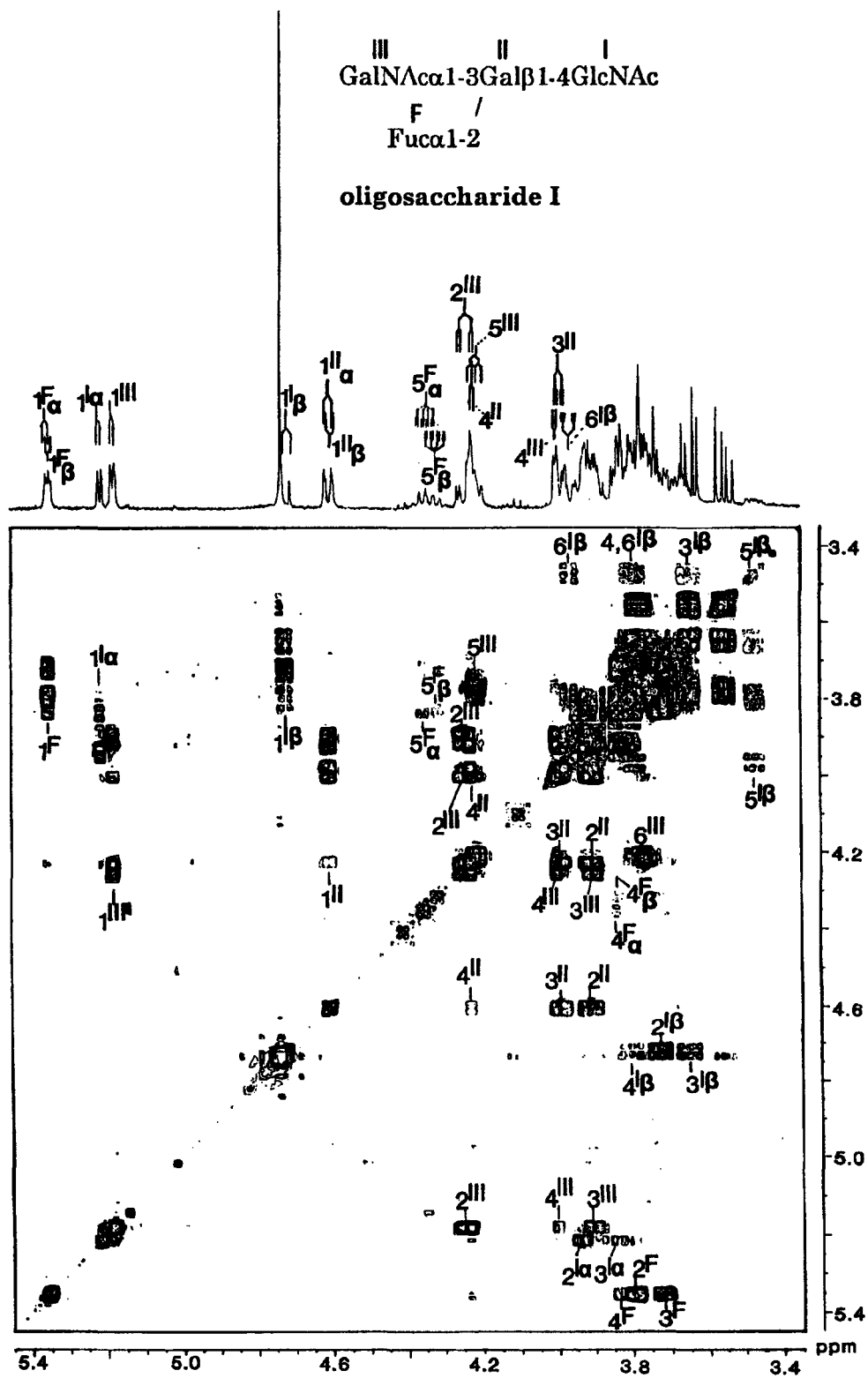


Figure 8. Double-relayed COSY spectrum of oligosaccharide I.

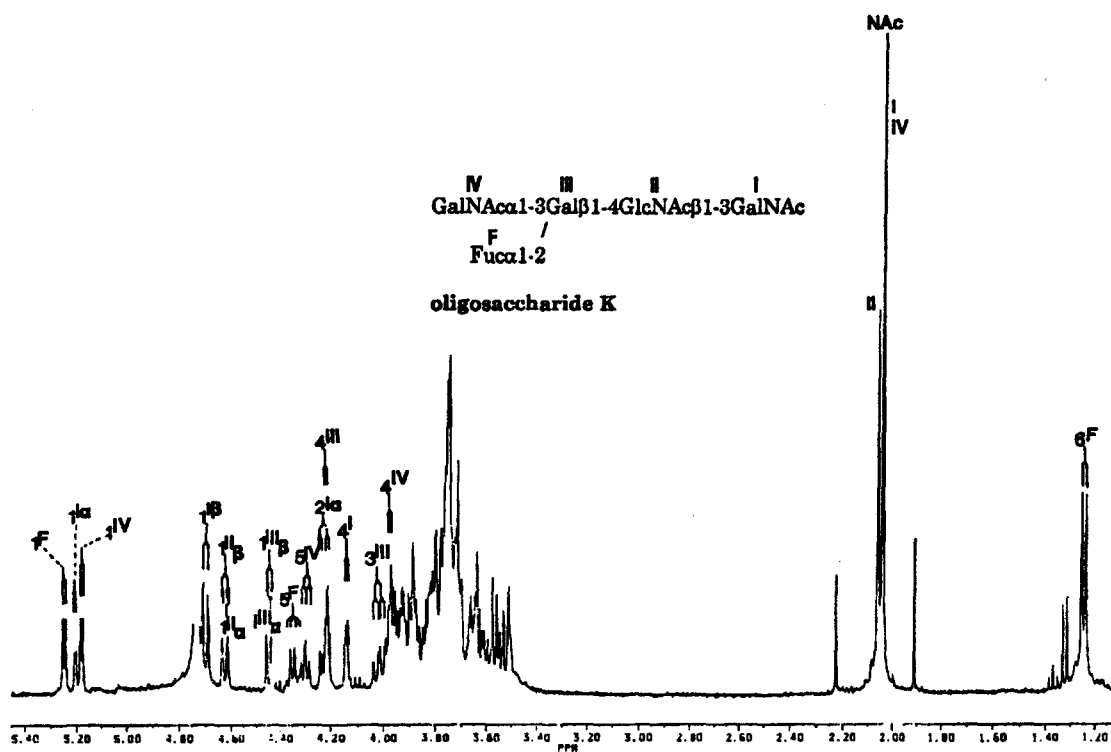
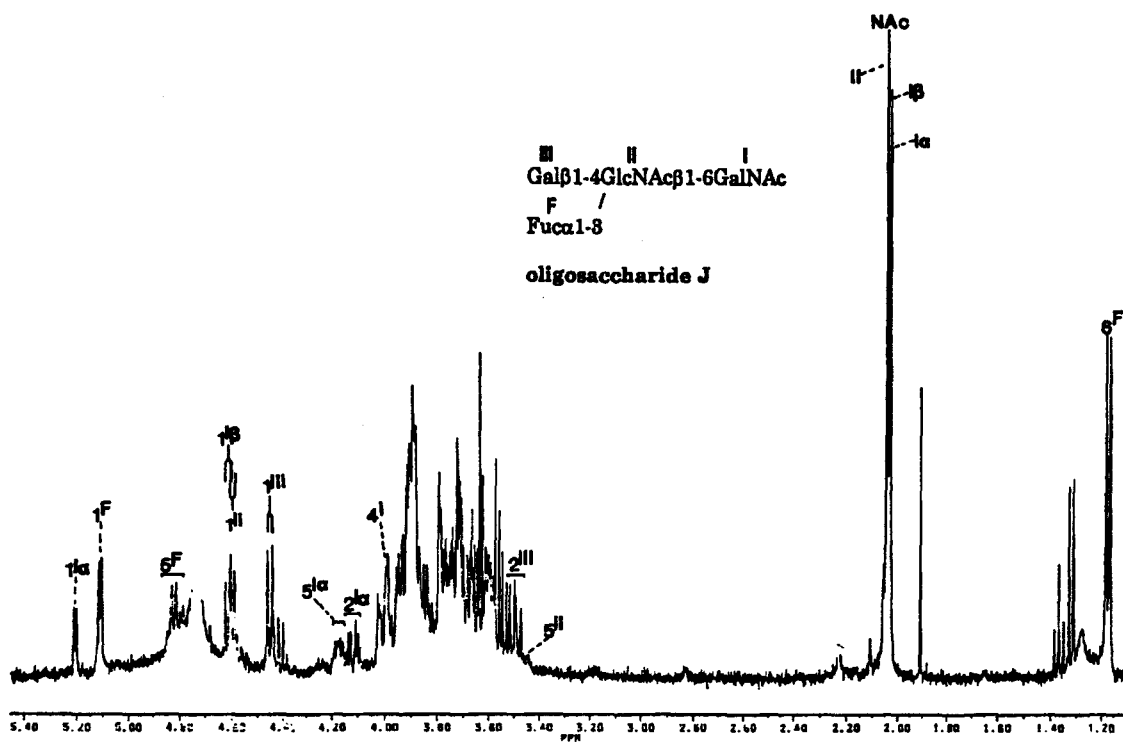


Figure 9. $^1\text{H-NMR}$ spectra of oligosaccharides J and K.



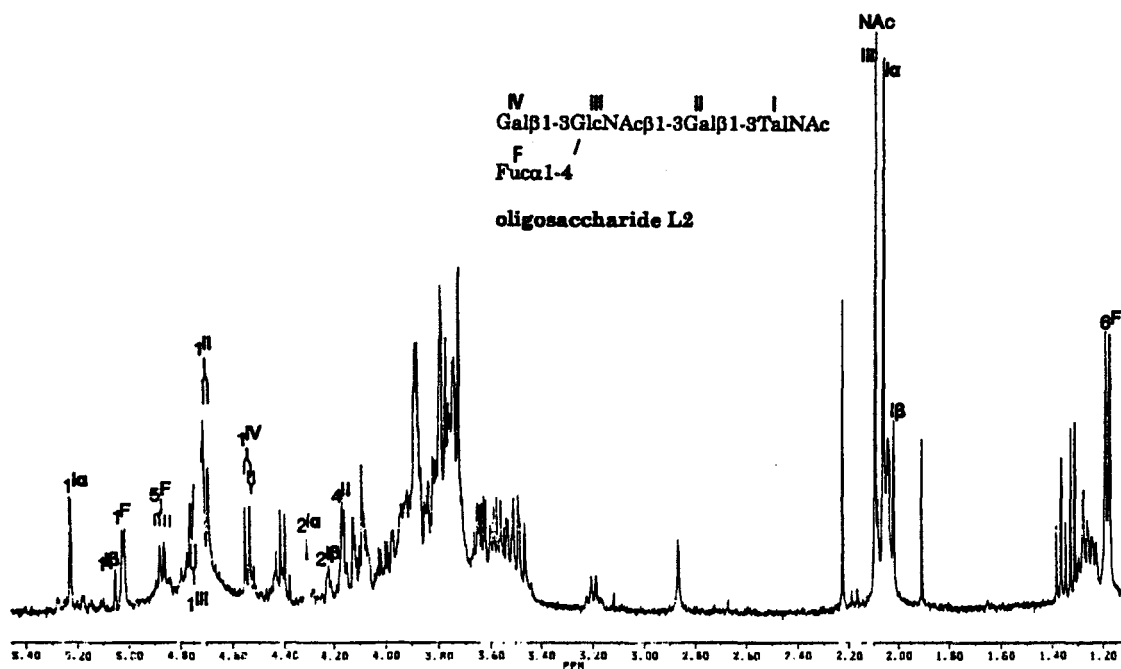
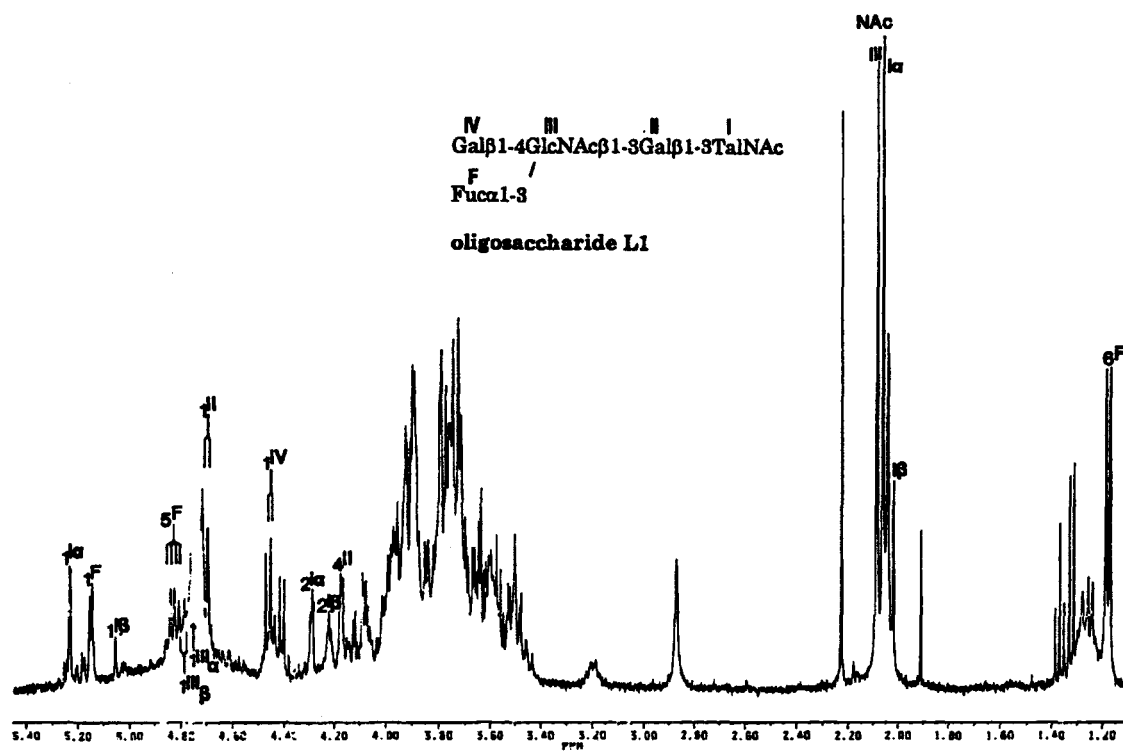


Figure 10. ^1H -NMR spectra of oligosaccharides L1 and L2.



LES GLYCOASPARAGINES ET OLIGOSACCHARIDES LIBRES

La seconde partie de notre travail a consisté en la caractérisation structurale des glycoconjugués trouvés à l'état libre dans le méconium: oligosaccharides dérivés du catabolisme des O- et N-glycannes, et glycoasparagines. Le schéma de fractionnement de ces constituants est présenté dans la figure 21 ci-dessous, et les résultats obtenus sont rassemblés dans les 2 articles soumis à publication présentés dans les pages suivantes.

Les résultats concernant le matériel oligosaccharidique libre de nature acide, actuellement en cours d'étude, ne sont pas montrés.

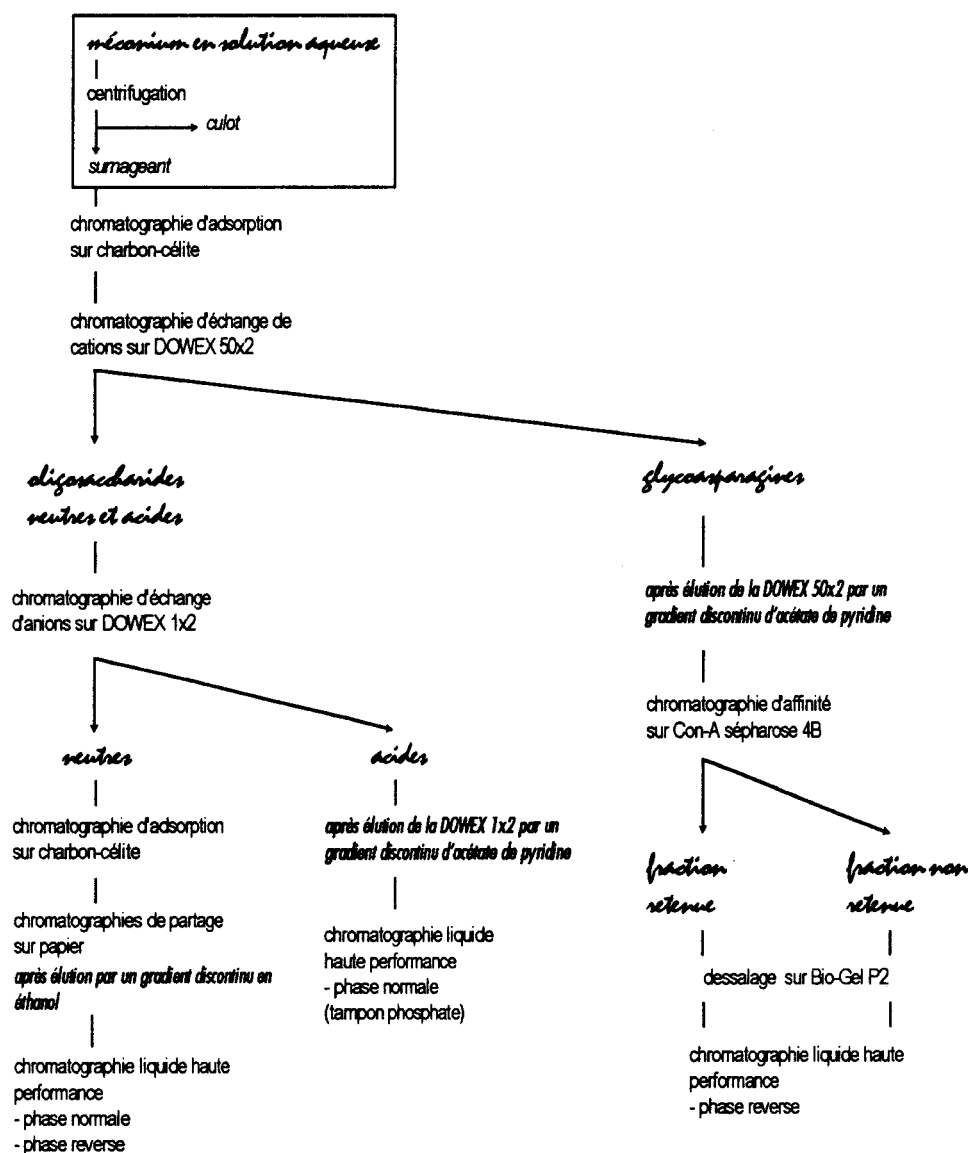


figure 21

schéma de fractionnement des oligosaccharides libres et glycoasparagines du méconium

ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF FREE NEUTRAL OLIGOSACCHARIDES FROM HUMAN MECONIUM

Olivier Cuvillier, Jean-Michel Wieruszkeski, Jean-Claude Michalski and Gérard Strecker.

Laboratoire de Chimie Biologique (UMR 111 CNRS), Université des Sciences et Technologies de Lille,
F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Tel: (33) 20.43.41.46

Fax: (33) 20.43.65.55

Correspondence address: Gérard Strecker, Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des
Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Abbreviations: NMR, Nuclear Magnetic Resonance; HPLC, High Performance Liquid
Chromatography; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Gal, D-galactosamine; Man, D-mannose; NAc, N-
acetyl; CH₃, methyl; Le, Lewis.

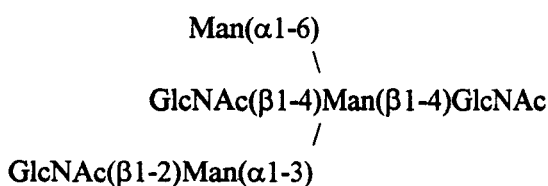
SUMMARY

Oligosaccharides were isolated from human meconium by mean of charcoal adsorption, paper
chromatography as well as HPLC. The structures of 9 new components have been established on the
basis of ¹H-400MHz-NMR spectroscopy. Their structures were:

Man(α1-6)[Man(α1-3)]Man(β1-4)GlcNAc

GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)[Man(α1-3)]Man(β1-4)GlcNAc

Man(α1-6)[GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)]Man(β1-4)GlcNAc



MATERIALS AND METHODS

Oligosaccharides fractionation

Meconium (2kg) was obtained from new-borns and homogenized with 5 l water. The insoluble material was separated by centrifugation. Supernatant was then submitted to adsorption chromatography on a charcoal-celite column (6x40cm). After washing with 5 l water, carbohydrate-containing material was desorbed with 10 l 50% (by vol.) ethanol in water. The concentrated sugar-containing eluate was desalted on a column (3x30cm) of Dowex 50x2 (200-400mesh, H⁺ form, Bio-Rad) by washing with water, and further submitted to adsorption chromatography on charcoal-celite column (6x40cm). Oligosaccharides were fractionated and desorbed by a discontinuous gradient of ethanol in water (3.5, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 and 40%, respectively) (Figure 1). The carbohydrate material was analyzed by paper chromatography on Whatman no.3 paper in the following solvent: ethyl acetate/ pyridine/ acetic acid/ water (5/5/1/3, by vol.) during 18 hours. An additive paper chromatography for 14 days is necessary for the separation of the heavier oligosaccharides (Figure 2). Carbohydrates were stained with aniline oxalate reagent: aniline/ ethanol/ 2.5% oxalic acid in water (2/100/150, by vol.). Finally, HPLC partition chromatography was performed on Zorbax-NH₂ column (5 μ m, 4.6x250mm, Shandon) using a mixture of acetonitrile/water (80/20 to 55/45, by vol. according to the alcoholic fractions). In all cases, the flow-rate was 1ml/min, detection was at 206nm (Figures 3-5).

400MHz ¹H-NMR spectroscopy

The 400 MHz ¹H-NMR experiments were performed on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5 mm ¹H/¹³C mixed probehead, operating in the pulse Fourier transform mode and controlled by an Aspect 3000 computer. Each oligosaccharide was dissolved in 0.45 ml D₂O after three exchanges with D₂O (99.96 % atom ²H) and intermediate lyophilisations. The products were analyzed at 300 K with a spectral width of 3000 Hz for 16 K frequency domain points and time domain data points giving a final digital resolution of 0.365 Hz / point. The 2D homonuclear COSY experiments were performed using the standard Bruker pulse program COSY. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm in ²H₂O at 27°C) with an accuracy of 0.002 ppm.

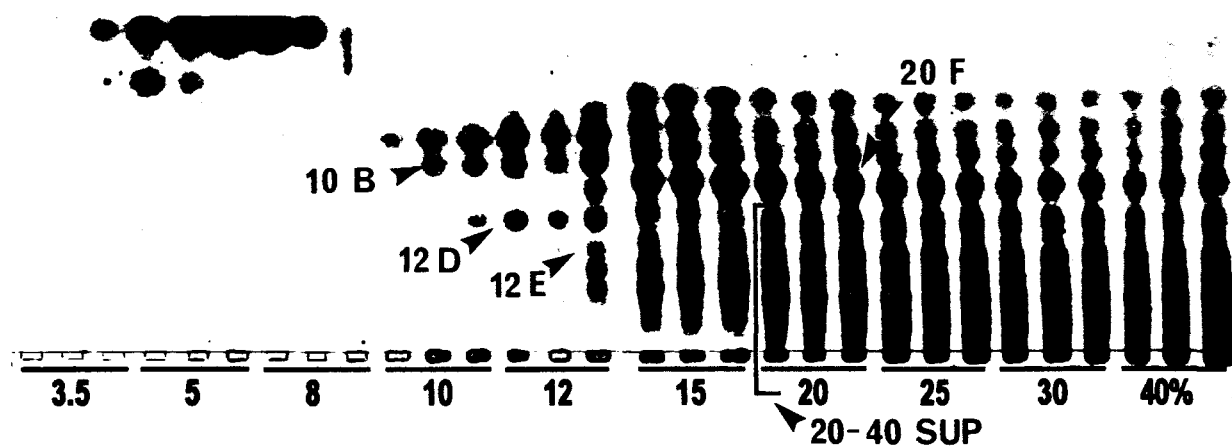


Figure 1.

Thin layer chromatography of neutral oligosaccharides eluted from charcoal-celite column by a discontinuous gradient of ethanol in water. Solvent system: ethanol/ butanol/ acetic acid/ water/ pyridin (100/10/3/30/10, by vol.). Oligosaccharides were vizualized with orcinol/ H_2SO_4 reagent.



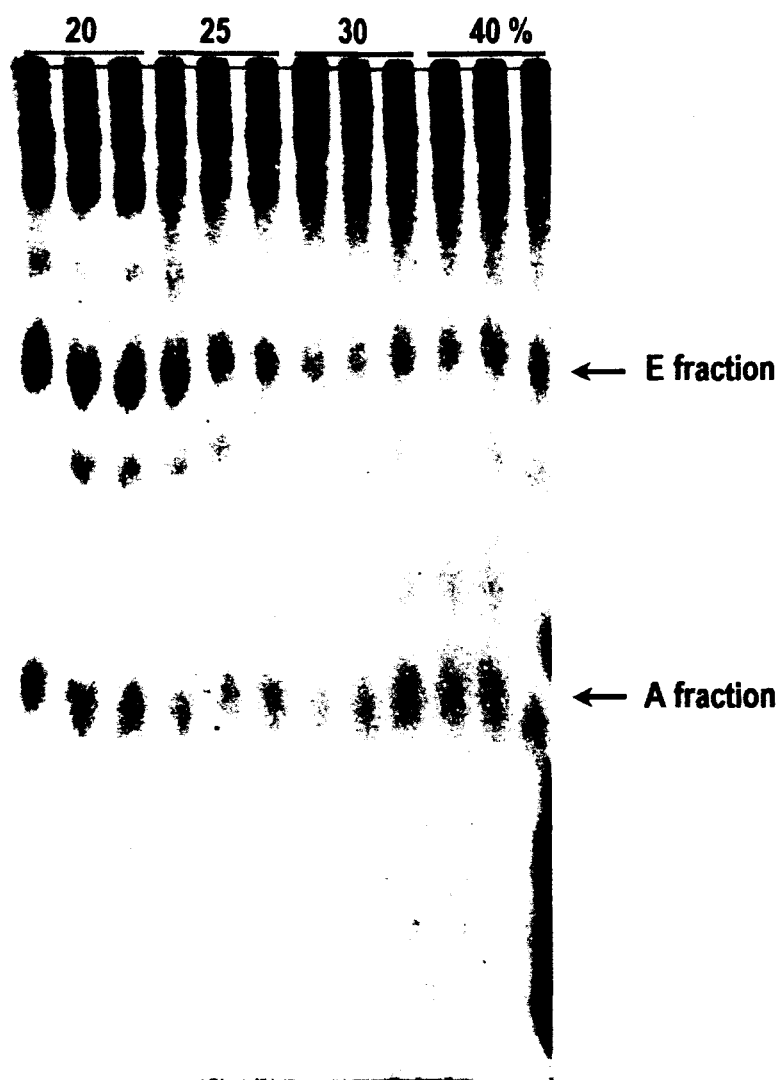


Figure 2.

Descending paper chromatography of heavier neutral oligosaccharides (fraction 20-40 SUP).

Solvent system: ethyl acetate/ pyridine/ acetic acid/ water (5/5/1/3, by vol.). Oligosaccharides were visualized with aniline oxalate reagent.

Time of migration = 14 days.

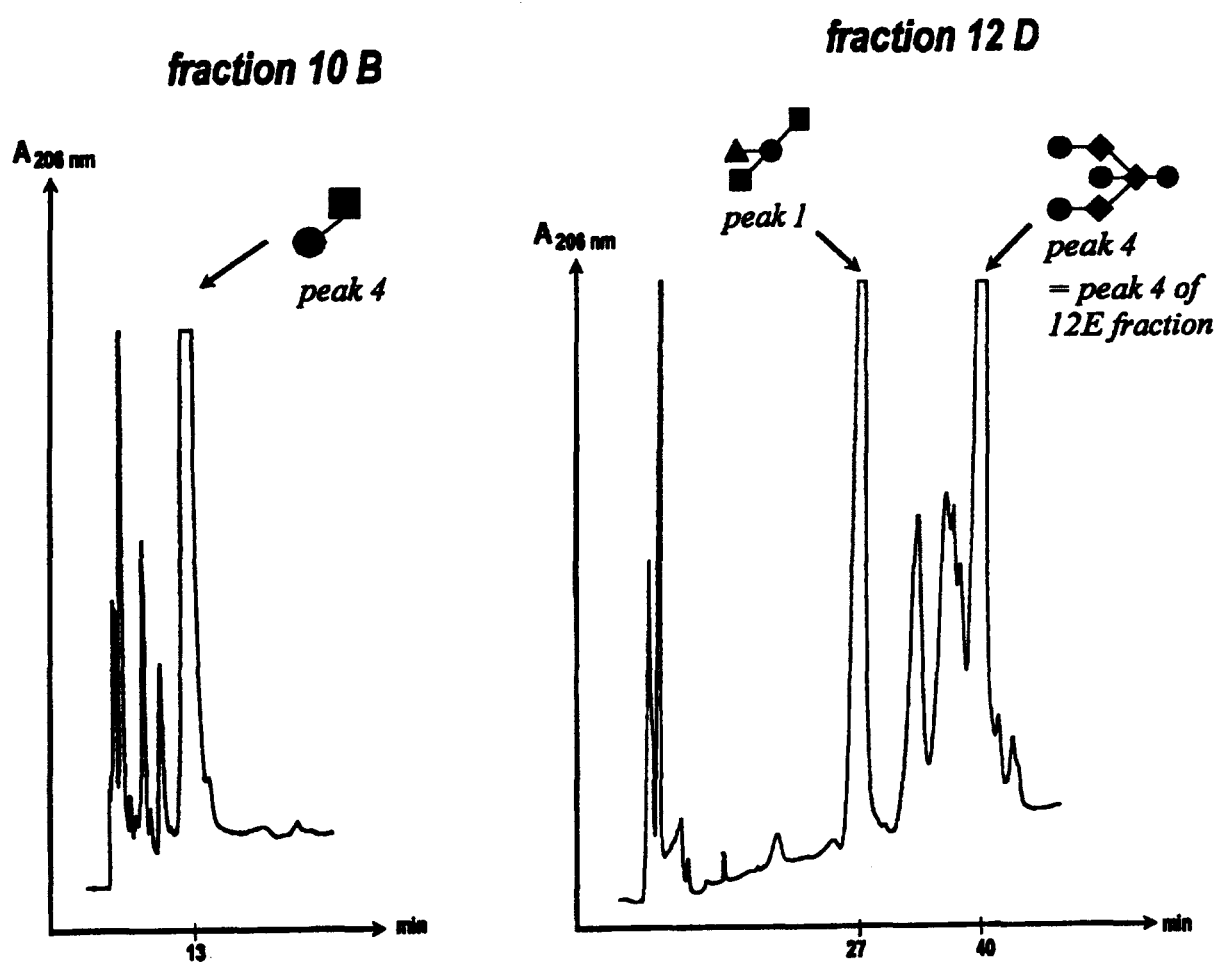


Figure 3.

HPLC elution profile of paper fractions *10 B* and *12 D* monitored at 206 nm. The Zorbax-NH₂ column was eluted with acetonitrile/water gradient (80/20 to 70/30 for 30 mn) at a flow-rate of 1 ml/mn.

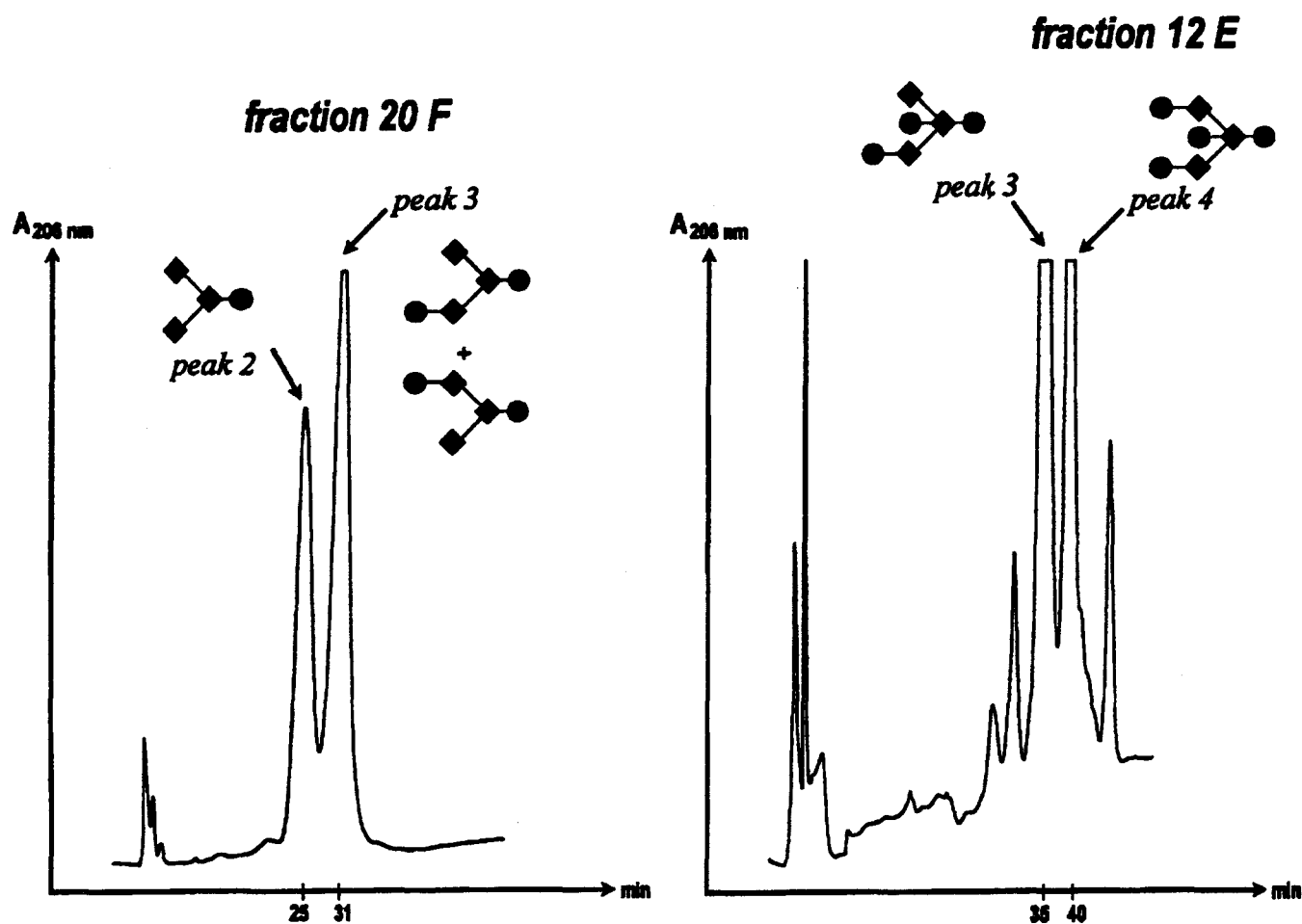


Figure 4.

HPLC elution profile of paper fractions *20 F* and *12 E* monitored at 206 nm. The Zorbax-NH₂ column was eluted with acetonitrile/water gradient (80/20 to 70/30 for 30 min, and 70/30 to 60/40 for 15 min) at a flow-rate of 1 ml/min.



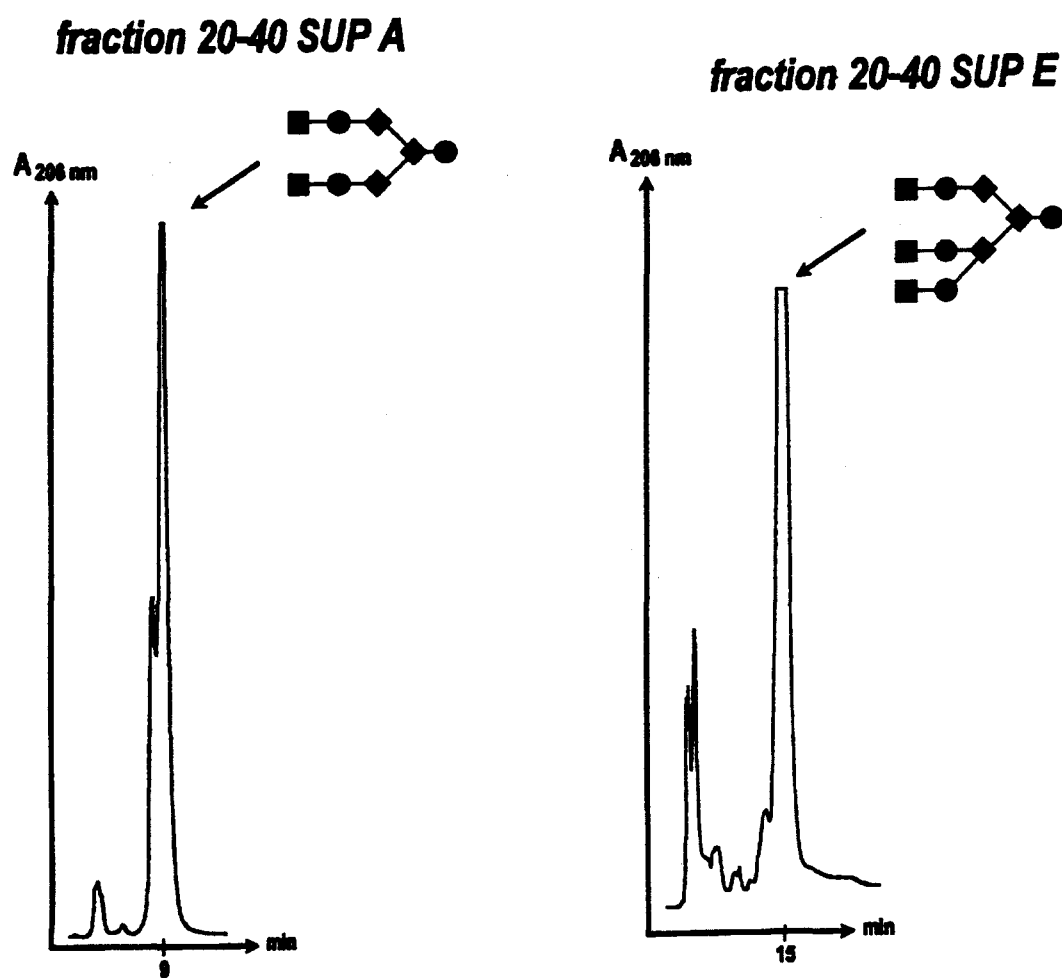


Figure 5.

HPLC elution profile of paper fractions *20-40 SUP A* and *20-40 SUP E* monitored at 206 nm. The Zorbax-NH₂ column was eluted with acetonitrile/water gradient (60/40 to 55/45 for 30 min) at a flow-rate of 1 ml/min.

RESULTS

Oligosaccharide 20 F2 (Table 1)

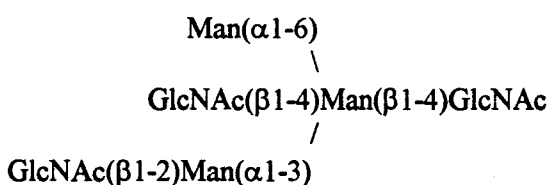
The NMR spectrum of 20 F2 shows the presence of major oligosaccharide composed of 3 Man and 1 GlcNAc residue. The two Man residue occur in terminal non reducing position, as attested by their upfield shifted H-2 atom resonances at $\delta = 4.071$ (Man 4) and 3.974 ppm (Man 4'), respectively. The H-1 atom resonance of GlcNAc, observed at 5.215 ppm is characteristic of GlcNAc 2 α . Therefore, the structure of compound was established to be: $\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

Oligosaccharides 20 F3 (Table 1, Figure 6)

Fraction 20 F3 is a mixture of two oligosaccharide isomers, since the NMR spectrum shows the presence of 4 Man H-2 atom resonances characteristic of terminal Man 4 and 4' ($\delta = 4.071$ and 3.970 ppm) and C-2 substituted Man 4 and 4' ($\delta = 4.188$ and 4.108 ppm). Traces of Gal are present which provided from contamination with a third component. Therefore, the two isomers were defined to be: $\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ and $\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

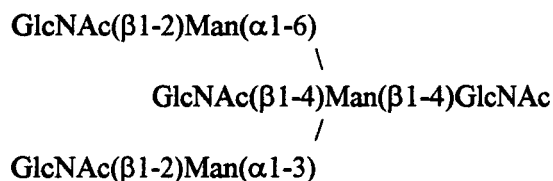
Oligosaccharide 12 E3 (Table 1, Figure 7)

For compound 12 E3, the two H-1 atom resonances of Man 4 and 4' observed at $\delta = 5.061$ and 4.965 ppm are significant of the presence of a bisecting GlcNAc residue (δ H-1 = 4.442 ppm). The H-2 resonance of Man 4' observed at 3.993 ppm indicate that this Man unit occurs in terminal non reducing position. The Man 4 and Man 3 H-2 resonances exhibit the characteristic inversion of their chemical shifts which is due to the presence of GlcNAc 2 β -1,4-linked to Man 3. On this basis of these observations, the compound was defined as:

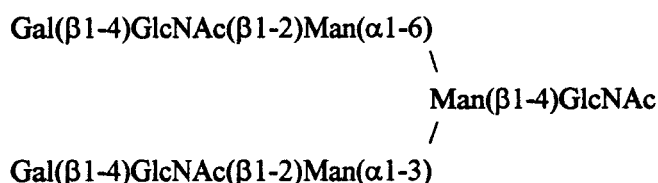


Oligosaccharide 12 E4 (Table 1, Figure 7)

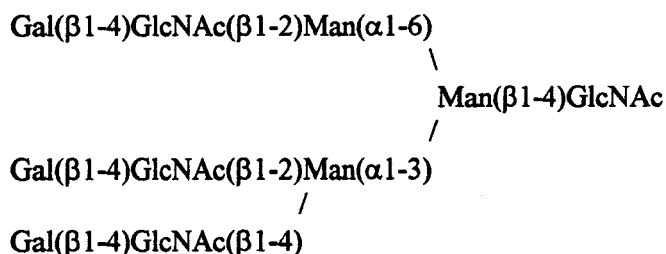
The NMR spectrum of compound 12 E4 is quite superposable to that of the heptasaccharide isolated from the urine of patient suffering from Sandhoff disease [12]. Therefore, the structure was defined to be:

**Oligosaccharides 20-40 SUP A and 20-40 SUP E**

The NMR spectra of compounds 20-40 SUP A and 20-40 SUP E (Figure 8 and Table 1) are characteristic of classical bi- and tri-antennary glycan structures [13]. Their structures are as follow:



and

**Oligosaccharide 10 B4** (Table 2)

Compound 10 B4 is a trisaccharide composed of Gal and GlcNAc. According to the 2 step COSY spectrum depicted in Figure 9, the anomeric proton observed at $\delta = 5.228$, 4.563 and 4.703 ppm were assigned to Gal α , Gal β and GlcNAc β respectively, on the basis of the set of their vicinal coupling constants. The C-3 atom resonance of Gal α and β are downfield shifted to 80.45 and 83.60 ppm,

respectively, proving the 1,3 linkage of GlcNAc to the Gal unit. Therefore, the structure of 10 B4 was established as: GlcNAc(β 1-3)Gal.

Oligosaccharide 12 D1 (Table 3)

According to its $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Figure 10), compound 12 D1 contains one Fuc, one GlcNAc and two Gal residues. The structural reporter groups of Fuc (H-1, H-5 and CH_3) are typical of an α -1,4-linked fucose unit involved in the Le^{a} determinant [13]. The Gal residue occurring in terminal reducing position (δ H-1 Gal α = 5.223 ppm, δ H-1 Gal β = 4.558 ppm) is C-3 substituted, as inferred by its downfield shifted H-4 atom resonance (δ H-4 = 4.143 (β) and 4.200 (α) ppm). Therefore, the structure of compound was established to be: Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal.

DISCUSSION

In this study, the structures of 9 new oligosaccharides from human meconium have been established on the basis of $^1\text{H-NMR}$ analysis. This work illustrates the suitability of this biological medium for the large scale preparation of oligosaccharides relating both to N-glycosylproteins and mucins. The carbohydrate chains of human meconium mucins have been extensively studied [1-4]. Most of them express blood group differentiation or tumor-associated activities [1-4, 14]. The free oligosaccharides occurring in human meconium originate from the catabolic process of N- and O-glycosylproteins in the foetal gastrointestinal tract [11]. Moreover, these carbohydrate chains have not been exposed to the degradative enzymes of bacteria.

Oligosaccharides 20 F2, 20 F3, 12 E3, 12 E4, 20-40 SUP A and 20-40 SUP E originate from the catabolism of N-glycans. Since all of these oligosaccharides possess a single reducing terminal GlcNAc, they should represent the hydrolysis product of the cytosolic endo- β -D-acetylglucosaminidase previously described in mammalian tissues [15-16].

The origine of oligosaccharides 10 B4 and 12 D1 terminated by a galactose residue is more speculative. It is tempting to suggest that these oligosaccharides originate from the catabolism of polyglucosamine glycans by the action of an endo- β -galactosidase on the sequence R-GlcNAc(β 1-3)Gal β 1-R'. Such enzymes have been described in bacteria [17-18], but not yet characterized in human tissues. Another

possibility is that these oligosaccharides originate from transfer reactions on the galactose residue, similar to those described for the human urine oligosaccharides [19].

Oligosaccharides 12 E3 and 12 E4 bear an bisecting GlcNAc residue. Such a structural feature has also found in glycoasparagines occurring in free state in meconium (in preparation). It is likely that this determinant is relatively abundant in the glycoprotein content of the foetal gastrointestinal tract. All of these oligosaccharides may be added to the list of the previously described components [11]. Their detailed study leads further insight in the metabolism of glycoconjugates at the end of embryonal development.

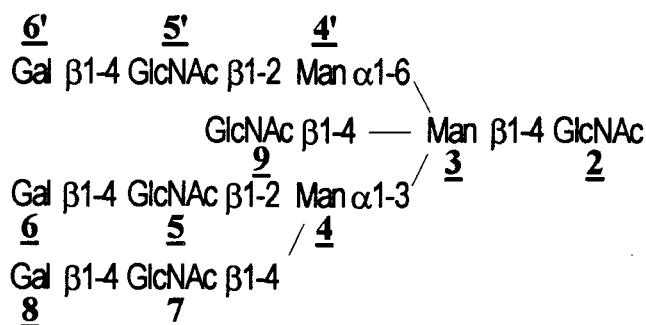
REFERENCES

- [1] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C. & Feizi, T. (1985) Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens, *Eur. J. Biochem.* 148, 367-377.
- [2] Capon, C., Leroy, Y., Wieruszeski, J.M., Ricart, G., Strecker, G., Montreuil, J. & Fournet, B. (1989) Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins, *Eur. J. Biochem.* 182, 139-152.
- [3] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M.S., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A., Feeney, J. & Feizi, T. (1989) Characterization by mass-spectrometry and 500-MHz proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of penta- and hexasaccharide chains of human foetal gastrointestinal mucins (meconium glycoproteins), *Eur. J. Biochem.* 186, 597-610.
- [4] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Cashmore, G.C., Kane, D.P., Stoll, M.S. & Feizi, T. (1988) Identification of a novel oligosaccharide backbone structure with a galactose residue monosubstitued at C-6 in human foetal gastrointestinal mucins, *Biochem. J.* 256, 397-401.
- [5] Karlsson, K.A. & Larson, G. (1979) Structural characterization of lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid isolated from human meconium, *J. Biol. Chem.* 254, 9311-9316.
- [6] Nilsson, O., Månsson, J.E., Tibblin, E. & Svennerholm, L. (1981) Gangliosides of human meconium - Detection of a possible fetal antigen, *FEBS Lett.* 133, 197-200

- [7] Karlsson, K.A. & Larson, G. (1981) Molecular characterization of cell surface antigens of fetal tissue. Detailed analysis of glycosphingolipids of meconium of a human O Le(a-b+) secretor, *J. Biol. Chem.* 256, 3512-3524
- [8] Svennerholm, L., Fredman, P., Månsson, J.E., Nilsson, O. & Holmgren, J. (1982) Gangliosides of human intestinal mucosa: detection of a possible fetal antigen, *Adv. Exp. Med. Biol.* 152, 333-342
- [9] Magnani, J.L., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Stepkowski, Z., Koprowski, H. & Ginsburg, V. (1982) A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated Lacto-N-fucopentaose II, *J. Biol. Chem.* 257, 14365-14369
- [10] Taki, T., Rokukawa, C., Kasama, T., Kon, K., Ando, S., Abe, T. & Handa, S. (1992) Human meconium gangliosides. Characterization of a novel I-type ganglioside with the NeuAc α 2-6Gal structure, *J. Biol. Chem.* 267, 11811-11817
- [11] Herlant-Peers, M.C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G.A. & Vliegthart, J.F.G. (1981) Structures of fifteen oligosaccharides isolated from new-born meconium, *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300.
- [12] Strecker, G., Herlant-Peers, M.C., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (GM₂ gangliosidosis - variant O), *Eur. J. Biochem.* 81, 165-171.
- [13] Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. & Van Halbeek, H. (1983) High-resolution, ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 209-374.
- [14] Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D. & Evans, M.J. (1981) Stage-specific embryonic antigen involves α 1-3 fucosylated type 2 blood group chains, *Nature* 292, 156-158.
- [15] Pierce, R.J., Spik, G. & Montreuil, J. (1979) Cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in rat liver and kidney, *Biochem. J.* 180, 673-676.
- [16] Pierce, R.J., Spik, G. & Montreuil, J. (1980) Demonstration and cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyl-lactosamine-type substrate in rat liver, *Biochem. J.* 185, 261-264.
- [17] Kitamikado, M., Ito, Y. & Li, Y.T. (1982) Endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*, in *Methods Enzymol.* (Ginsburg, V., ed.) pp. 619-625, Academic Press Inc.

- [18] Scudder, P., Lawson, A.M., Hounsell, E.F., Carruthers, R.A., Child, R.A. & Feizi, T. (1987) Characterization of oligosaccharides released from human-blood-group O erythrocytes glycopeptides by the endo- β -galactosidase of *Bacteroides fragilis*. A study of the enzyme susceptibility of branched poly (N-acetyllactosamine) structures, *Eur. J. Biochem.* 168, 585-593.
- [19] Strecker, G., Riazi-Farзад, T., Fournet, B., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1976) Structure et propriétés immunochimiques des oligosaccharides urinaires excrétés au cours de la galactosurie provoquée, *Biochimie* 58, 815-825.

Table 1. ^1H chemical shifts of structural-reporter group protons of constituent monosaccharides for free neutral human meconium oligosaccharides originate from the catabolism of N-glycans.



Reporter group	Residue	Chemical shift in						
		<i>20 F2</i>	<i>20 F3</i>	<i>12 E3</i>	<i>12 E4</i>	<i>20-40 SUP A</i>	<i>20-40 SUP E</i>	
		ppm						
H-1 of	2 (α)	5.215	5.206	5.213	5.207	5.206	5.212	5.211
	3 (α)	4.789	4.782	4.782	nd	-	4.776	4.767
	3 (β)	4.782	4.772	4.772	nd	-	4.766	4.756
	4	5.107	5.122	5.106	5.061	5.062	5.122	5.122
	4'	4.917	4.917	4.917	4.965	4.998 (α) 5.003 (β)	4.926	4.923
	5	-	4.555	-	4.534	4.554	4.584	4.570
	5'	-	-	4.555	-	-	4.584	4.585
	6	-	-	-	-	-	-	4.463
	6'	-	-	-	-	-	-	4.468
	7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	4.468	
9	-	-	-	4.442	4.469	-	-	
H-2 of	3	4.264 (α) 4.254 (β)	4.262 (α) 4.252 (β)	4.262 (α) 4.252 (β)	4.199 (α) 4.188 (β)	4.188 (α) 4.176 (β)	4.258 (α) 4.247 (β)	4.220 (α) 4.208 (β)
	4	4.071	4.188	4.071	4.249	4.247	4.192	4.216
	4'	3.974	3.970	4.108	3.393	4.148	4.113	4.113
NAc of	2	2.058 (α) 2.055 (β)	2.059 (α) 2.055 (β)	2.059 (α) 2.055 (β)	2.065 (α) 2.055 (β)	2.059 (α) -	2.060 (α) 2.058 (β)	2.060 (α) 2.057 (β)
	5	-	2.059	-	2.065	2.059	2.052	2.050
	5'	-	-	2.052	-	2.052	2.048	2.048 (α) 2.046 (β)
	7	-	-	-	-	-	-	2.077
	9	-	-	-	2.068	2.068	-	-

In the table heading, the structures are represented by short-band symbolic notation: ● = GlcNAc; ◆ = Man; ■ = Gal. nd means not determined.

Table 2. ¹H and ¹³C-NMR chemical shifts of the oligosaccharide *10B4*.

Residue	δ of														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-6	C-7	CO	CH ₃
	ppm														
GlcNAc(β1-3)	4.703	3.753	3.753	3.464	3.445	3.899	2.041	103.98	57.07	75.06 (α)	71.05	77.01	61.85	176.31	23.52
						3.763				74.96 (β)					
Galα	5.228	3.855	3.704	4.197	4.085	3.71	-	97.86	68.66	80.45	70.38	71.39	62.40	-	-
β	4.563	3.533	3.889	4.140	3.688	3.75	-	93.73	-	83.60	69.75	76.04	62.22	-	-



Table 3. $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the oligosaccharide **12 D1**.

Residue		δ in ppm
H-1	Fuc(α 1-4)	5.024
	Gal(β 1-3)	4.503
	GlcNAc(β 1-3)	4.720
	Gal α	5.223
	β	4.558
H-2	Gal(β 1-3)	3.484
H-4	Gal α	4.200
	β	4.143
H-5	Fuc(α 1-4)	4.863
	Gal α	4.08.
CH3	Fuc(α 1-4)	1.179
NAc	GlcNAc(β 1-3)	2.034

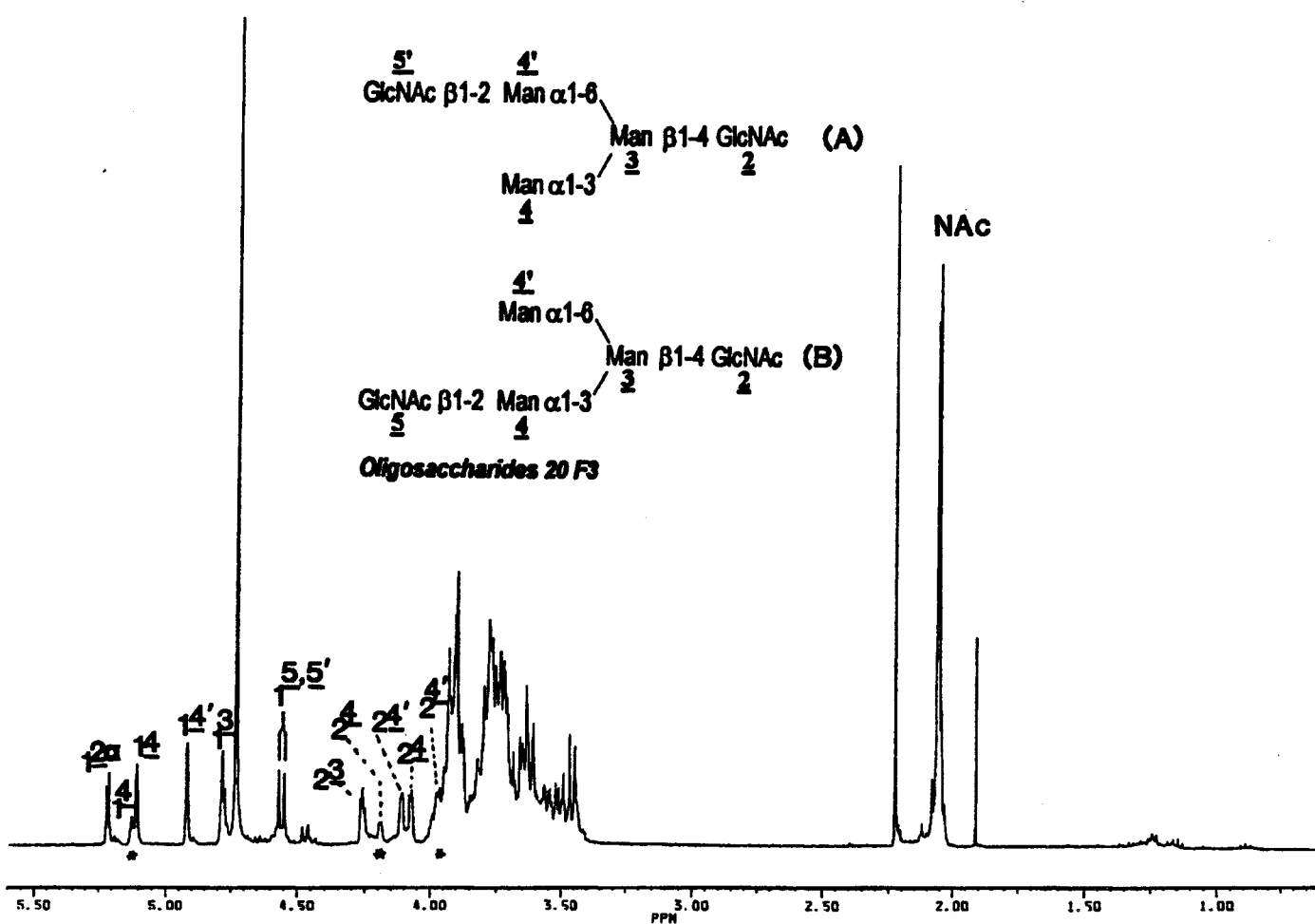


Figure 6.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum of oligosaccharides from fraction 20F3.

Signal indicated with asterisk are relative to compound 20F3 (B)



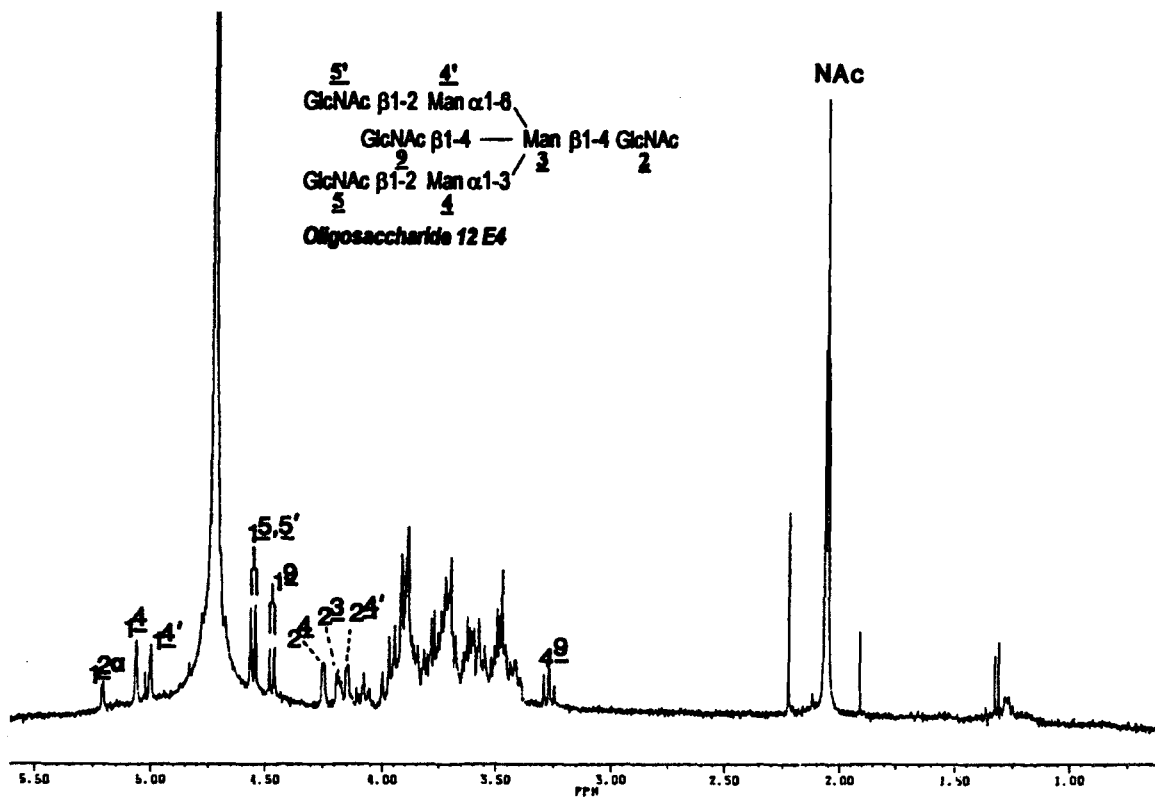
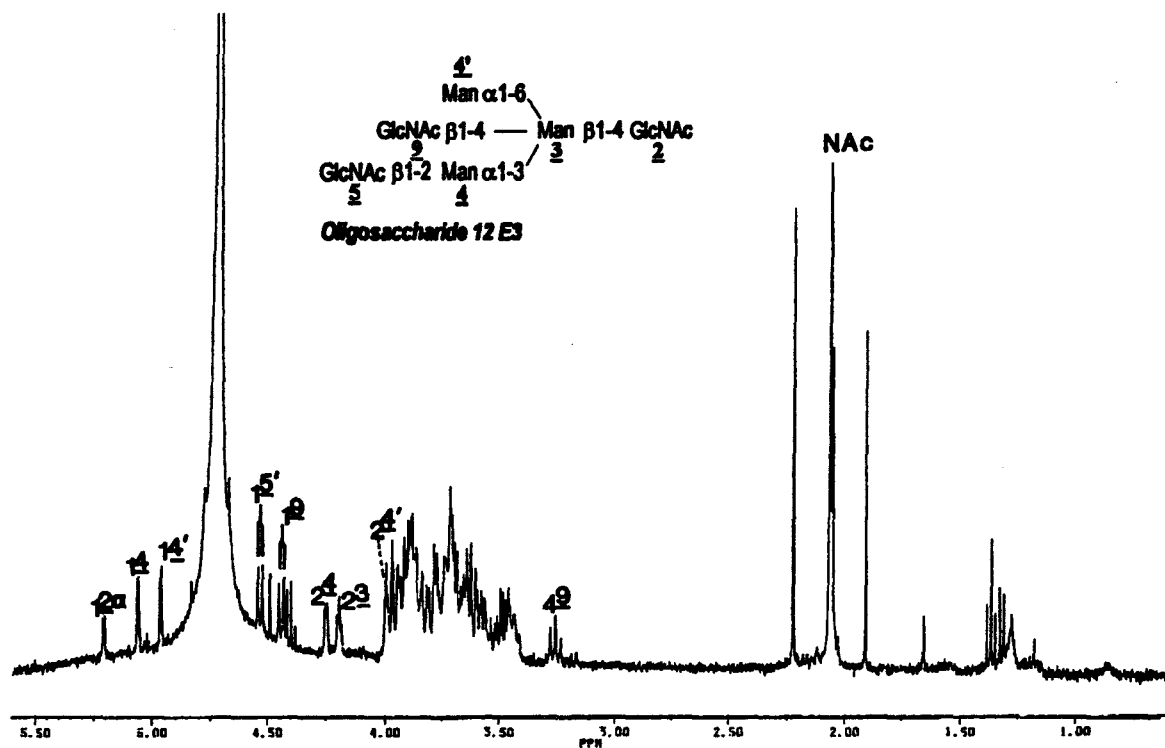


Figure 7. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of oligosaccharides *12E3* and *12E4*.

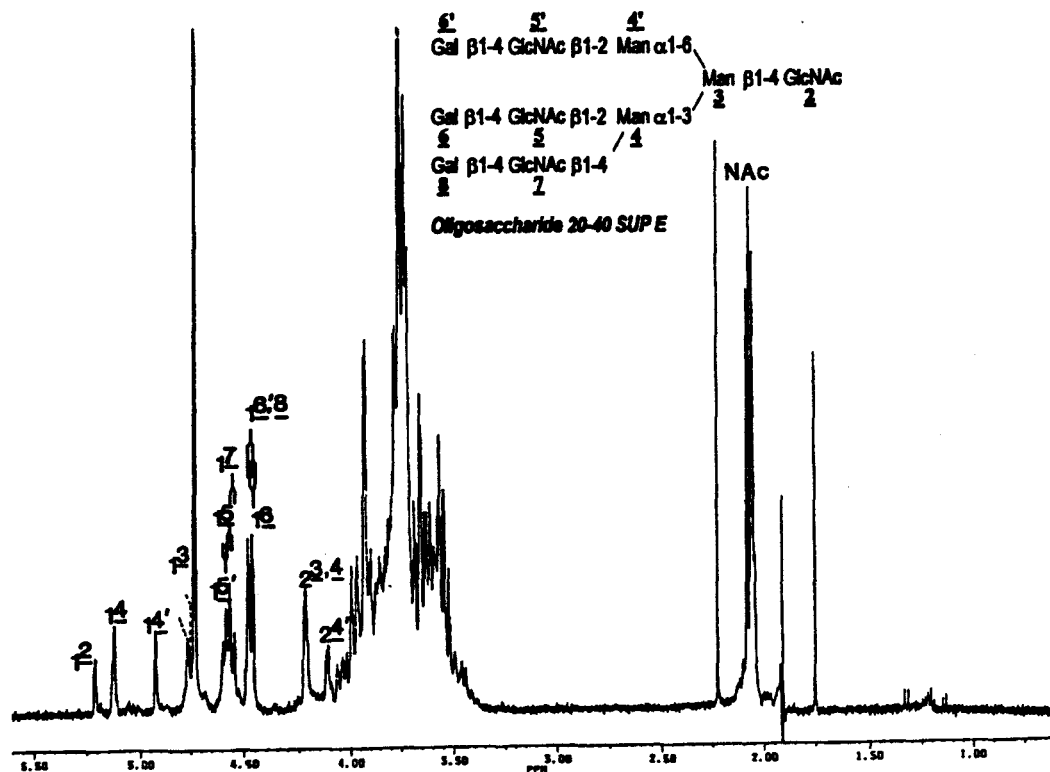
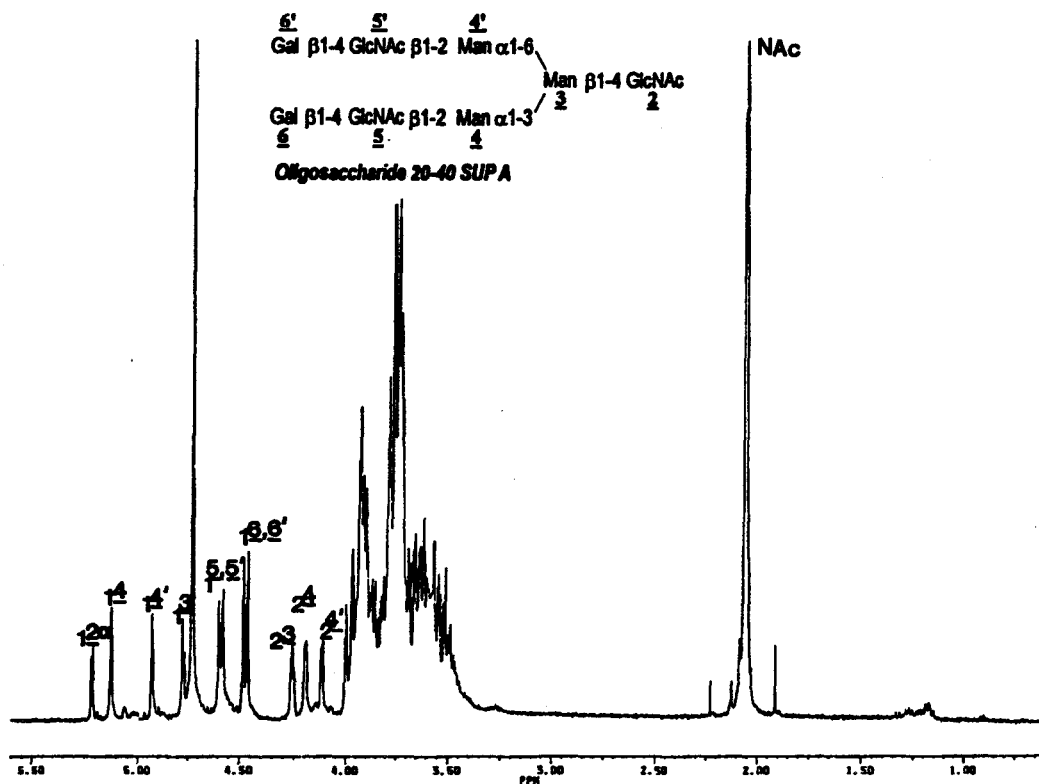


Figure 8.

¹H-NMR spectrum of oligosaccharides 20-40 SUP A and 20-40 SUP E.



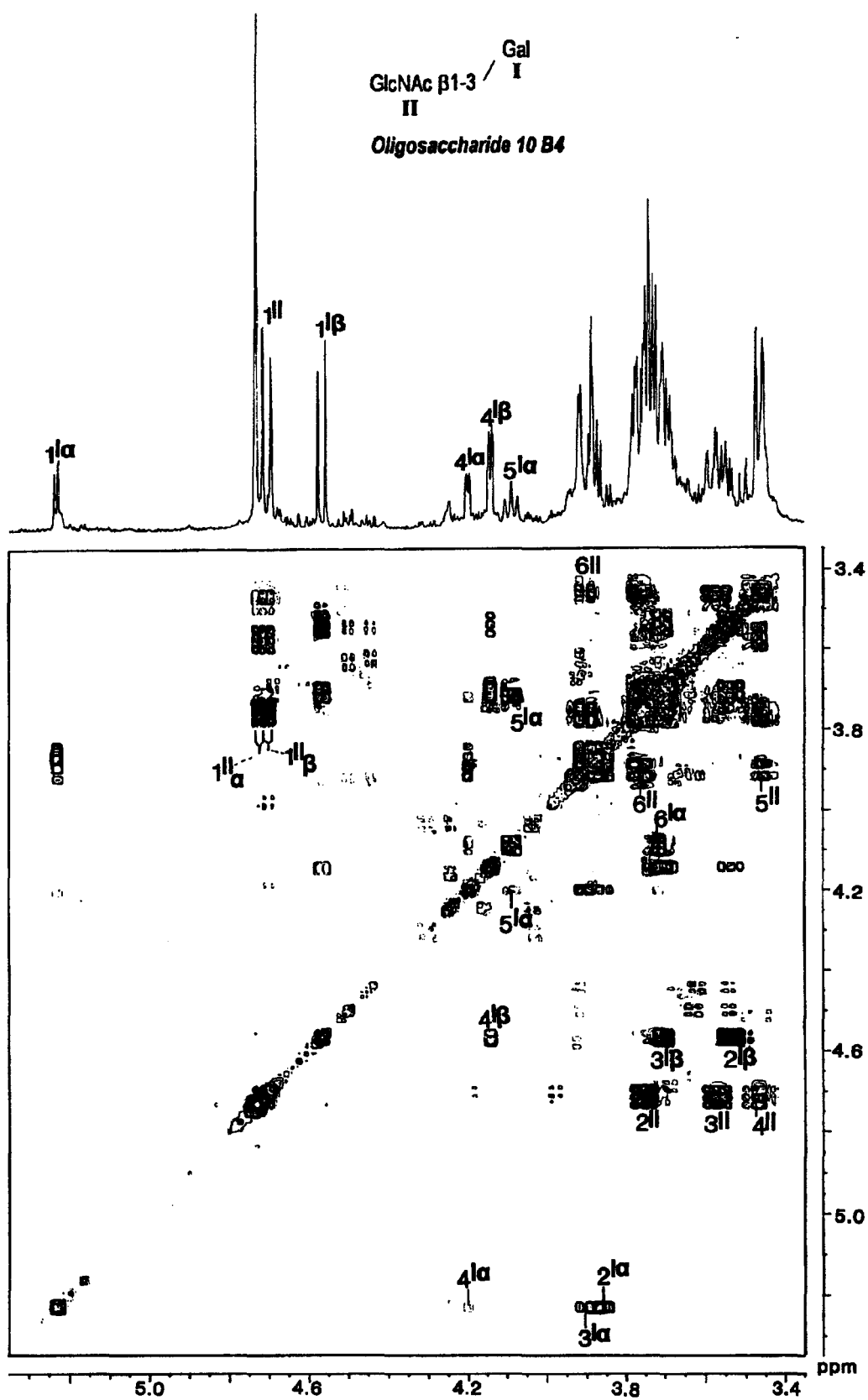


Figure 9. Doubled-relayed COSY spectrum of oligosaccharide 10 B4.



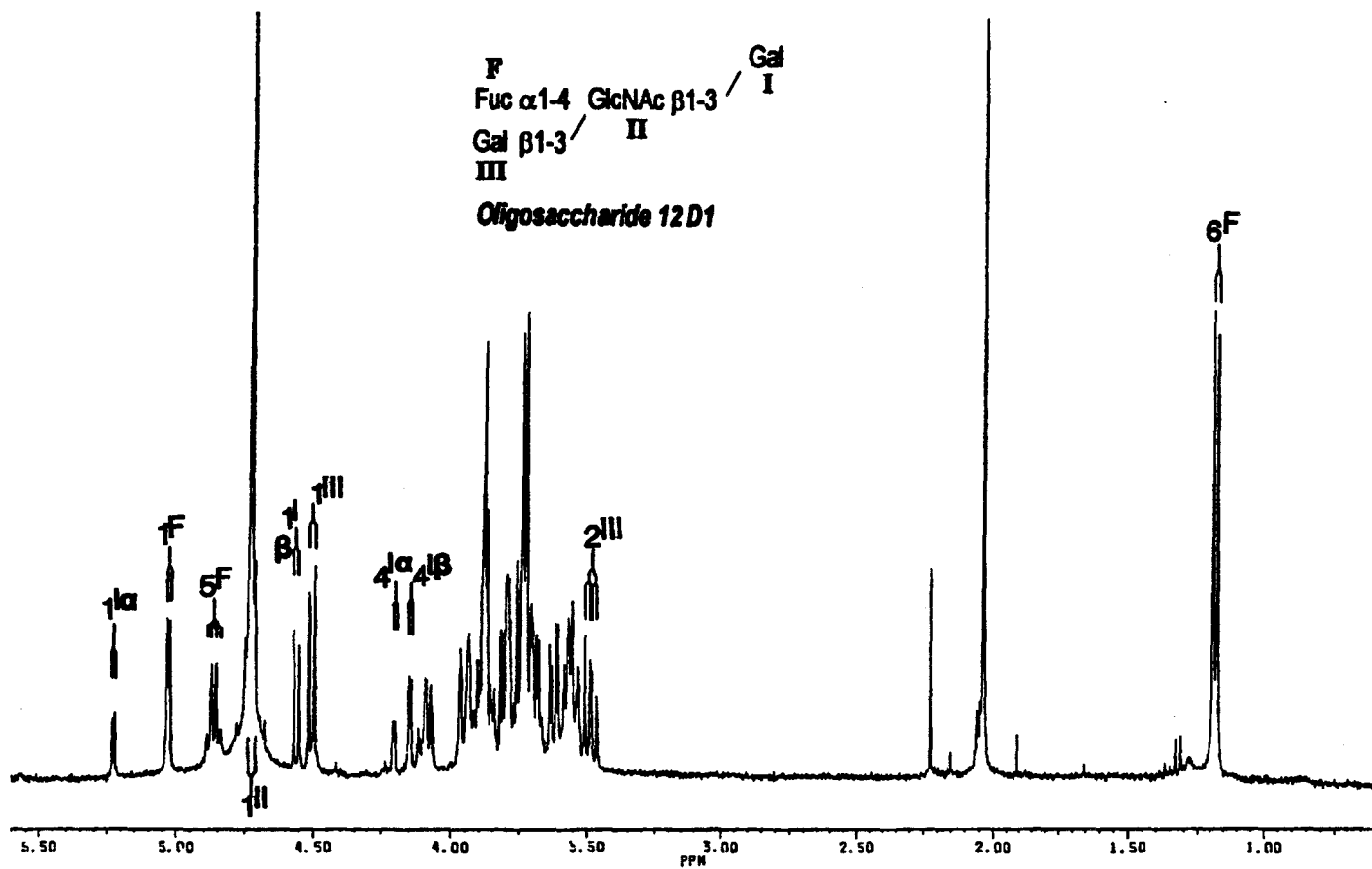


Figure 10.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum of oligosaccharide *12 D1*.



Acknowledgements

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111: Relation structure-fonction des constituants membranaires; director: Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandre-Artois and by the Ministère de l'Education Nationale. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR apparatus.

FIRST EVIDENCE OF HUMAN MECONIUM GLYCOASPARAGINES

Olivier Cuvillier, Catherine Alonso, Jean-Michel Wieruszkeski, Jean-Claude Michalski and Gérard Strecker.

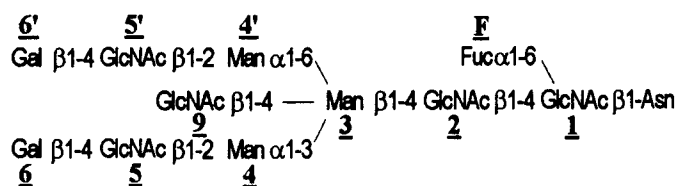
Laboratoire de Chimie Biologique (UMR 111 CNRS), Université des Sciences et Technologies de Lille,
F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Tel: (33) 20.43.41.46

Fax: (33) 20.43.65.55

Correspondence address: Gérard Strecker, Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Abstract: Glycoasparagines have been isolated from human meconium by a combination of ion-exchange, Con A-affinity and HPLC chromatographies. Their structures have been established by 400MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. All of the glycoasparagines are related to N-acetylglucosaminic type structures and originated from the common core:



Keywords: Glycoasparagine; Meconium; Nuclear Magnetic Resonance; N-glycosylproteins catabolism.

Abbreviations: Asn, Asparagine; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; ConA, Concanavalin A; Man, Mannose; Gal, Galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Fuc, Fucose.

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Meconium, present in the gastrointestinal tract of the neonate, is a rich source of carbohydrate containing material previously described to contain a great variety of glycosphingolipids [1-11], free oligosaccharides [12], mucins [13-17] and oligosaccharides chains released from non specific cross-reacting antigen-2 (NCA-2) physicochemically similar to carcinoembryonic antigen [18]. Most of them present oncofoetal determinants similar to those found on the cancer cells surface. Here, we described for the first time the isolation and the structural characterization of different glycoasparagines, which occurs in free state in meconium. The major glycoasparagines have been isolated by a combination of ion-exchange, affinity and HPLC chromatography. Their structures have been established by ^1H -400 MHz spectroscopy.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Glycoasparagine fractionation (figure 1)

Meconium obtained from new-borns, was homogenized with 5 l water and the insoluble material was separated by centrifugation. Supernatant was then submitted to adsorption chromatography on a charcoal-celite column (6x40cm). After washing with 5 l water, carbohydrate-containing material was desorbed with 10 l 50% (by vol.) ethanol in water. The alcoholic eluate was evaporated to dryness, the residue dissolved in water and applied on a column (3x30cm) of Dowex 50x2 (200-400mesh, H^+ form, Bio-Rad). After washing by water, glycoasparagines were fractionated with a discontinuous gradient of pyridine acetate buffer (2, 5, 8, 10, 15, 25, 50 and 100mM, respectively), pH 5.5. The glycoasparagine fractions (figure 2) obtained after ion-exchange chromatography were desalted on a Bio-Gel P₂ column (2x50cm, Bio-Rad) with water as eluant. Further subfractionation by affinity chromatography was realized on Con A-Sepharose column (1.5x10cm, Pharmacia) equilibrate in 5mM sodium acetate buffer (pH5.2) containing 0.1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ and 1mM MgCl₂. In this way, non-reactive glycoasparagines were eluted at void volume column with the equilibration buffer. Strongly reactive components were eluted with 0.1M methyl α -D-glucoside. Purification of the fractions was performed by gel-filtration on a Bio-Gel P₂ column (2x50cm, Bio-Rad) equilibrated with water. The last step of glycoasparagines fractionation was performed by reverse-phase HPLC on Zorbax-ODS-C18 column

(5 μ m, 4.6x250mm, Shandon) using water as eluant for 45 min followed by a linear gradient to 5% acetonitrile in water (v/v) in 30 min (figure 3). The flow-rate was 1ml/mn, detection was at 206nm.

2.2. 400MHz ¹H-NMR spectroscopy

The 400 MHz ¹H-NMR experiments were performed on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5 mm ¹H/¹³C mixed probehead, operating in the pulse Fourier transform mode and controlled by an Aspect 3000 computer. Each oligosaccharide was dissolved in 0.45 ml D₂O after three exchanges with D₂O (99.96 % atom ²H) and intermediate lyophilisations. The products were analyzed at 300 K with a spectral width of 3000 Hz for 16 K frequency domain points and time domain data points giving a final digital resolution of 0.365 Hz / point. The 2D homonuclear COSY experiments were performed using the standard Bruker pulse program COSY. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm in ²H₂O at 27°C) with an accuracy of 0.002 ppm.

3. RESULTS

3.1. Glycoasparagine fractionation

Glycoasparagines were subdivided in 27 fractions after ion-exchange chromatography on Dowex 50x2 according to the concentration of pyridine acetate used for the elution. When analyzed by TLC (figure 2) each fraction appears to be heterogeneous, with a major band of low-migration corresponding to the glycoasparagines. Fractions presenting similar TLC pattern were pooled and further subdivided in a ConA reative (ConA-R) and a ConA non-reactive (ConA-NR) subfraction after ConA sepharose affinity chromatography. Further purification was achieved by reverse-phase HPLC. In this chromatographic system, glycoasparagines isomers are separated not only according to their molecular weigh, but also according to the nature of the constituent monosaccharides. Compounds with "bisecting" GlcNAc elute later in the acetonitrile gradient. Figure 3 illustrates the profile obtained for the fraction 50mM ConA-NR. The structures of the main components were established by 400 MHz ¹H-NMR spectroscopy.

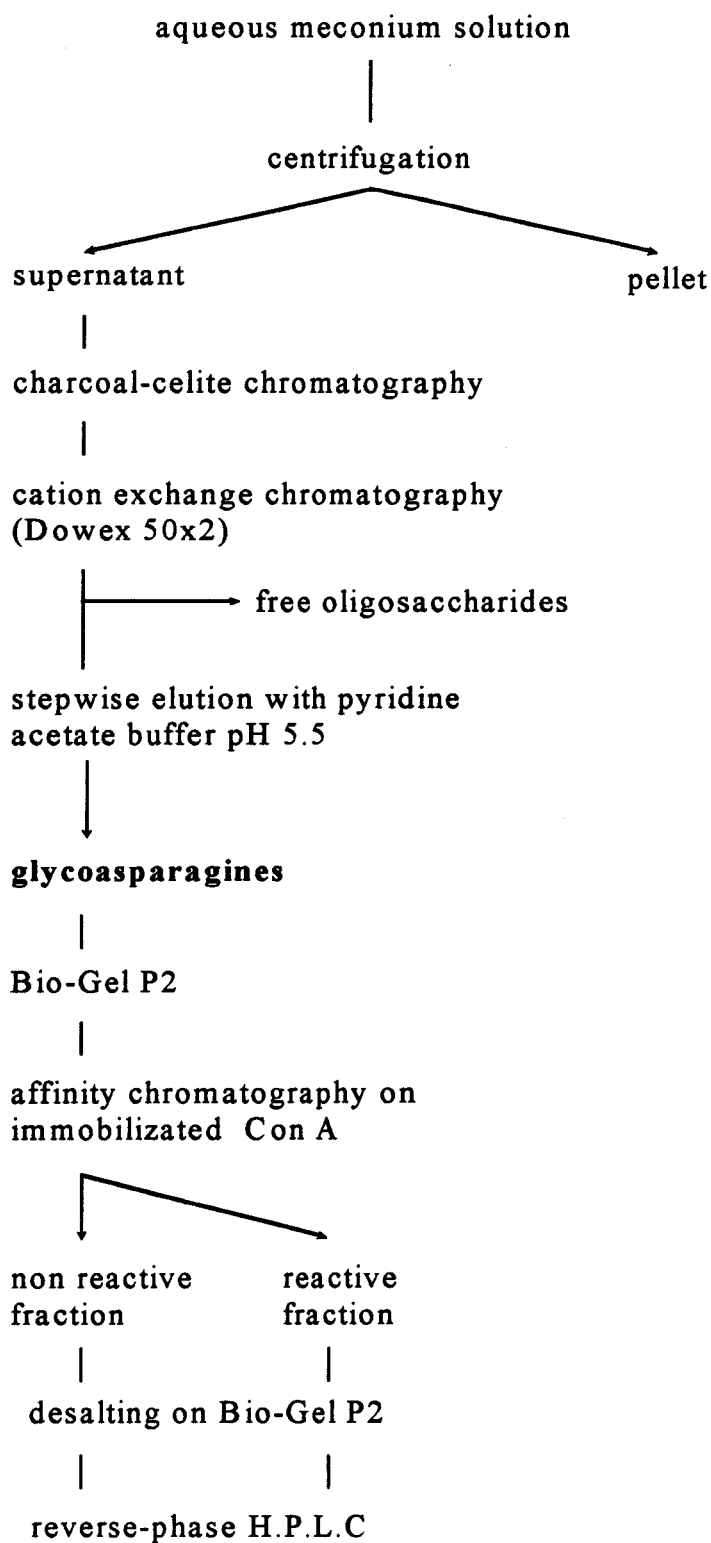


Figure 1.

Fractionation of glycoasparagines

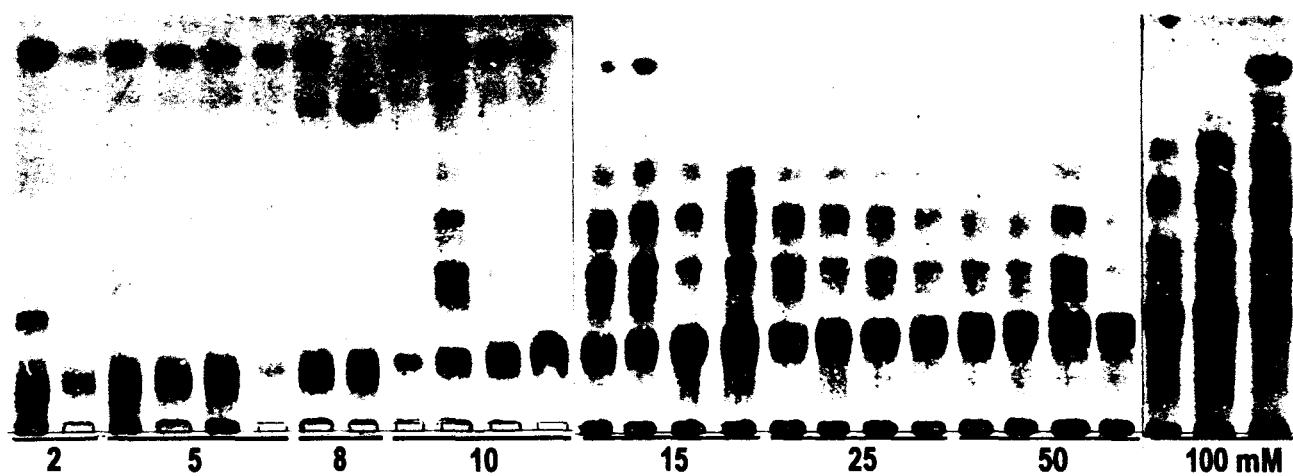


Figure 2.

Thin layer chromatography of glycoasparagines eluted from a Dowex 50x2 column by a discontinuous gradient of pyridin acetate.

Solvent system: ethanol/butanol/acetic acid/ water/pyridin (100/10/3/30/10, by vol.).

Glycoasparagines were vizualized with orcinol/ H_2SO_4 reagent.



glycoasparagine 50mM ConA-NR

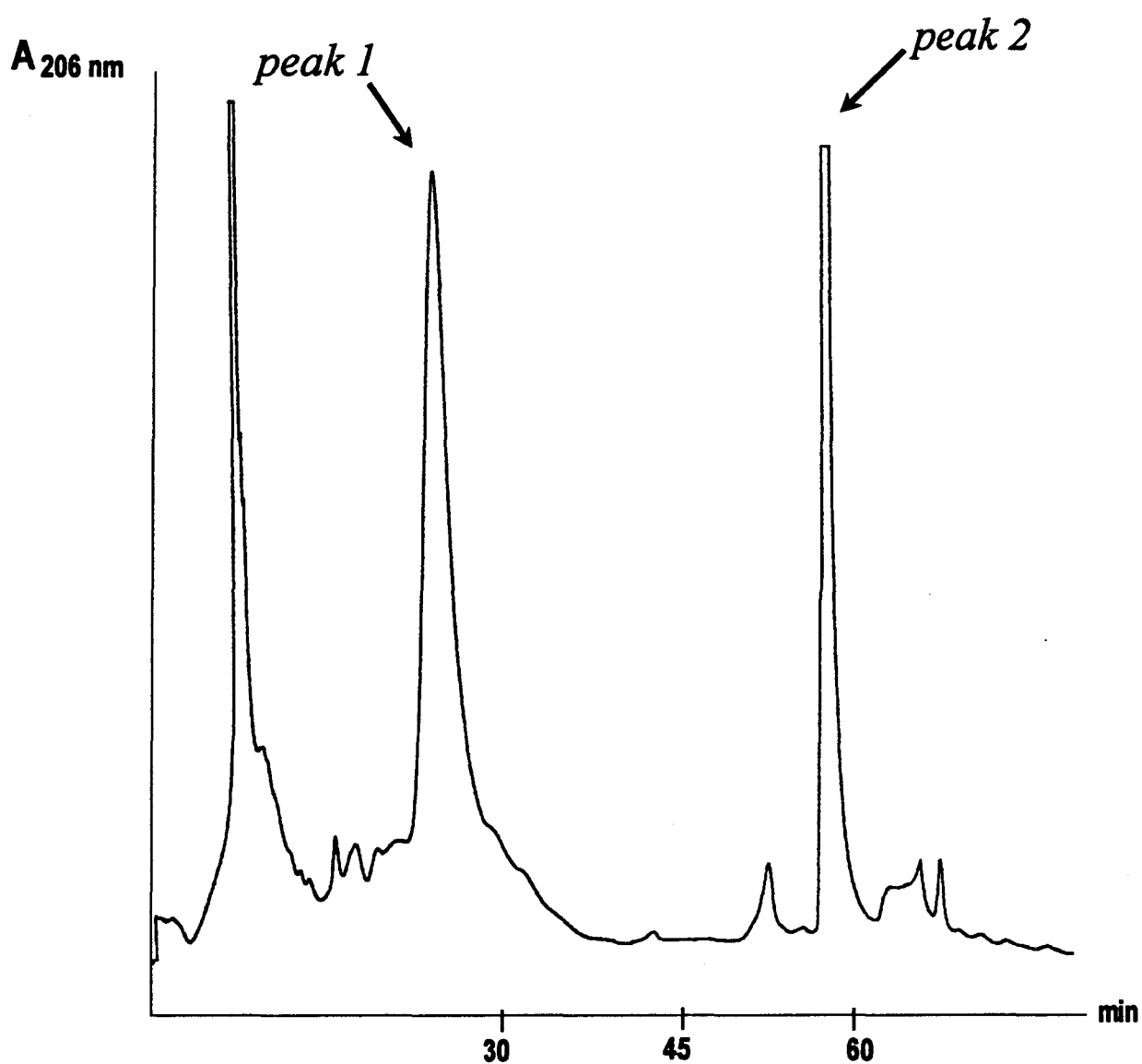


Figure 3.

HPLC elution profile of fraction 50mM ConA-NR monitored at 206nm.

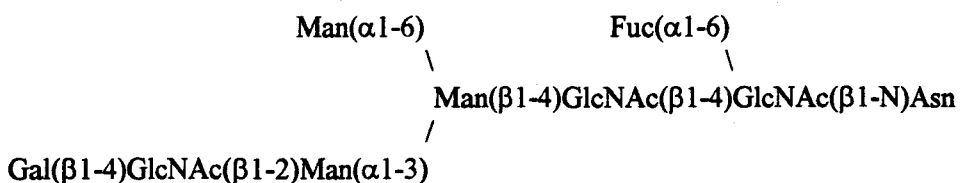
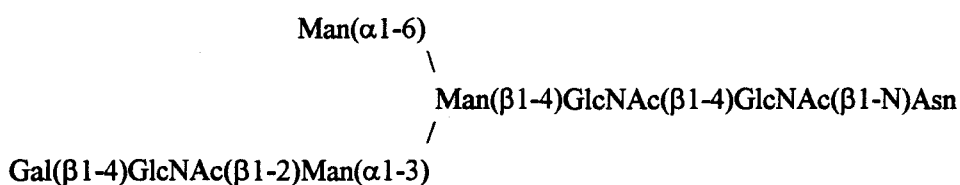
The Zorbax-ODS-C18 column was eluted with water for 45 min followed by a linear gradient to 5% acetonitrile in water (v/v) in 30 min, at a flow-rate of 1ml/min.



3.2. 400MHz $^1\text{H-NMR}$ analysis

Glycoasparagines 50mM-1 ConA-NR

From the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 50mM-1 ConA-NR (figure 4, table 1), it can be deduced that Man 4' residue occurs at non reducing position, according to its H-1 and H-2 atom resonances observed at 4.916 and 3.965 ppm, respectively. The presence of Gal 6 H-1 signal at $\delta = 4.466$ ppm confirm the integrity of the second branch. The low intensity of the structural-reporter groups of Fuc and the doubling of GlcNAc 2 NAc resonance allow to establish the two structures present in fraction 50mM-1 ConA-NR to be:



Glycoasparagine 50mM-2 ConA-NR

The NMR spectral parameters for glycoasparagine present in fraction 50mM-2 ConA-NR (figure 4, table 1) show close similarities to those acquired for fucosylated bi-antennary glycan structures possessing a bisecting GlcNAc residue (δ H-1 = 4.466 ppm, δ NAc = 2.066 ppm). Moreover, the characteristic Man 4, 4' and 3 H-1 resonances observed at 5.056, 4.996 and 4.697 ppm confirm this structural element. The presence of Fuc α -1,6-linked to GlcNAc 1 is verified by the structural reporter group of Fuc (δ H-1 = 4.877 ppm, δ H-5 = 4.126 ppm, δ CH₃ = 1.204 ppm) and the downfield shift of GlcNAc 2 NAc at 2.091 ppm. GlcNAc 5 and 5' occur in terminal non reducing position, as shown by the chemical shifts of their structural reporter groups [20], and the absence of signals relevant from Gal residues. The β and β' atom resonances are observed at $\delta = 2.800$ and 2.617 ppm. Therefore, the structure of compound 50mM-2 ConA-R was established as follow:

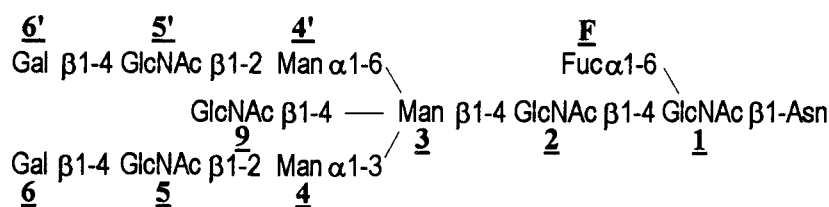
oligosaccharides (in preparation), these glycoasparagines originate from incomplete catabolism of N-glycans. Most of them possess α -1,6 linked fucose to GlcNAc 1 attached to asparagine. A possible origin for these compounds may be the absence or low activity of aspartylglucosaminidase or α -fucosidase. These enzymes have been demonstrated as the first hydrolases involved in degradation of N-glycans, and the hydrolysis of α -1,6 fucose and asparagine appears to be prerequisite steps to the further recurrent hydrolysis by exoglycosidases [22,23]. Similar glycoasparagines accumulated in the urine and tissues of patients suffering from the genetic diseases aspartylglucosaminuria or fucosidosis [24,25]. Since all of the oligosaccharides found in meconium terminated by a single GlcNAc residue, it may be assumed that they originate from the hydrolysis of these glycoasparagines by an endo- β -acetylhexosaminidase similar to that described in rat liver cytosol [26,27]. Additively to these glycoasparagines, human meconium contains smaller glycopeptides, corresponding to O-linked glycans, their study is currently in progress.

REFERENCES

- [1] Karlsson, K.A. and Larson, G. (1978) FEBS Lett. 87, 283-287.
- [2] Karlsson, K.A. and Larson, G. (1979) J Biol Chem. 254, 9311-9316.
- [3] Karlsson, K.A. and Larson, G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3512-3524.
- [4] Nilsson, O., Månsson, J.E., Tibblin, E. and Svennerholm, L. (1981) FEBS Lett. 133, 197-200.
- [5] Svennerholm, L., Fredman, P., Månsson, J.E., Nilsson, O. and Holmgren, J. (1982) Adv. Exp. Med. Biol. 152, 333-342.
- [6] Magnani, J., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14365-14369.
- [7] Prieto, P.A. and Smith, D.F. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 241, 281-289.
- [8] Larson, G. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 246, 531-545.
- [9] Prieto, P.A. and Smith, D.F. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 249, 243-253.
- [10] Fredman, P., Månsson, J.E., Wikstrand, C.J., Vrionis, F.D., Rynmark, B.M., Bigner, D.D. and Svennerholm, L. (1989) J. Biol. Chem. 264, 12122-12125.
- [11] Taki, T., Rokukawa, C., Kasama, T., Kon, K., Ando, K., Abe, T. and Handa, S. (1992) J. Biol. Chem. 267, 11811-11817.

- [12] Herlant-Peers, M.C., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 291-300.
- [13] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C. and Feizi, T. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 367-377.
- [14] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Cashmore, G.C., Kane, D.P., Stoll, M. and Feizi, T. (1988) *Biochem. J.* 256, 397-401.
- [15] Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M.S., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A., Feeney, J. and Feizi, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* 186, 597-610.
- [16] Capon, C., Leroy, Y., Wieruszski, J.M., Ricart, G., Strecker, G., Montreuil, J. and Fournet, B. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 139-152.
- [17] Lawson, A.M., Hounsell, E.F., Stoll, M.S., Feeney, J., Chai, W., Rosankiewicz, J.R. and Feizi, T. (1991) *Carbohydr. Res.* 221, 191-208.
- [18] Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Endo, T. and Kobata, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17873-17881.
- [19] Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D. & Evans, M.J. (1981) *Nature* 292, 156-158.
- [20] Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. & Van Halbeek, H. (1983) *Chem. Biochem.* 41, 209-374.
- [21] Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B.L., Vliegthart, J.F.G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* 77, 15-20.
- [22] Baussant, T., Strecker, G., Wieruszski, J.M., Montreuil, J. & Michalski, J.C. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 381-385.
- [23] Kuranda, M.J. & Aronson, N.N. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5803-5809.
- [24] Lundblad, A., Masson, P.K., Nurden, N.E., Svensson, S., Öckerman, P.A. & Palo, J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 209-214.
- [25] Michalski, J.C., Wieruszski, J.M., Alonso, C., Cache, P., Montreuil, J. & Strecker, G. (1991) *Eur. J. Biochem.* 201, 439-458.
- [26] Pierce, R.J., Spik, G. & Montreuil, J. (1979) *Biochem. J.* 180, 673-676.
- [27] Pierce, R.J., Spik, G. & Montreuil, J. (1980) *Biochem. J.* 185, 261-264.

Table 1. ^1H chemical shifts of structural-reporter group protons of constituent monosaccharides for human meconium glycoasparagines.



Reporter group		Residue	Chemical shift in						
			50mM-2 ConA-R	25mM-2 ConA-R	100mM-2 ConA-R	50mM-1 ConA-R	50mM-2 ConA-NR	50mM-1 ConA-NR	
			ppm						
H-1 of	1		5.072	5.073	5.072	5.072	5.073	5.072	5.072
	2		4.618	4.684	4.684	4.618	4.678	4.616	nd
	3		4.765	4.766	4.76	4.76	4.697	4.76	4.76
	4		5.122	5.121	5.119	5.118	5.056	5.120	5.120
	4'		4.926	4.924	4.916	4.924	4.996	4.916	4.916
	5		4.582	4.582	4.582	4.556	4.552	4.578	4.578
	5'		4.582	4.582	4.555	4.581	4.547	-	-
	9		-	-	-	-	4.466	-	-
	6		4.468	4.468	4.466	-	-	4.466	4.466
	6'		4.474	4.474	-	4.473	-	-	-
	Fuc		-	4.877	4.872	4.876	4.877	-	4.873
H-2 of	3		4.246	4.247	4.250	4.248	4.176	4.250	4.250
	4		4.191	4.190	4.187	4.188	4.246	4.188	4.188
	4'		4.111	4.107	4.111	4.108	4.144	3.965	4.965
H-5 of	Fuc		-	4.124	4.124	4.126	4.126	-	4.126
NAc of	1		2.013	2.016	2.013	2.016	2.015	2.013	2.015
	2		2.079	2.093	2.089	2.093	2.091	2.079	2.090
	5		2.051	2.047	2.050	2.053	2.058	2.050	2.050
	5'		2.046	2.050	2.052	2.047	2.046	-	-
	9		-	-	-	-	2.066	-	-
CH ₃ of	Fuc		-	1.206	1.204	1.204	1.204	-	1.204

In the table heading, the structures are represented by short-band symbolic notation: ● = GlcNAc; ◆ = Man; ■ = Gal; ▲ = Fuc and A = Asn. nd means not determined.

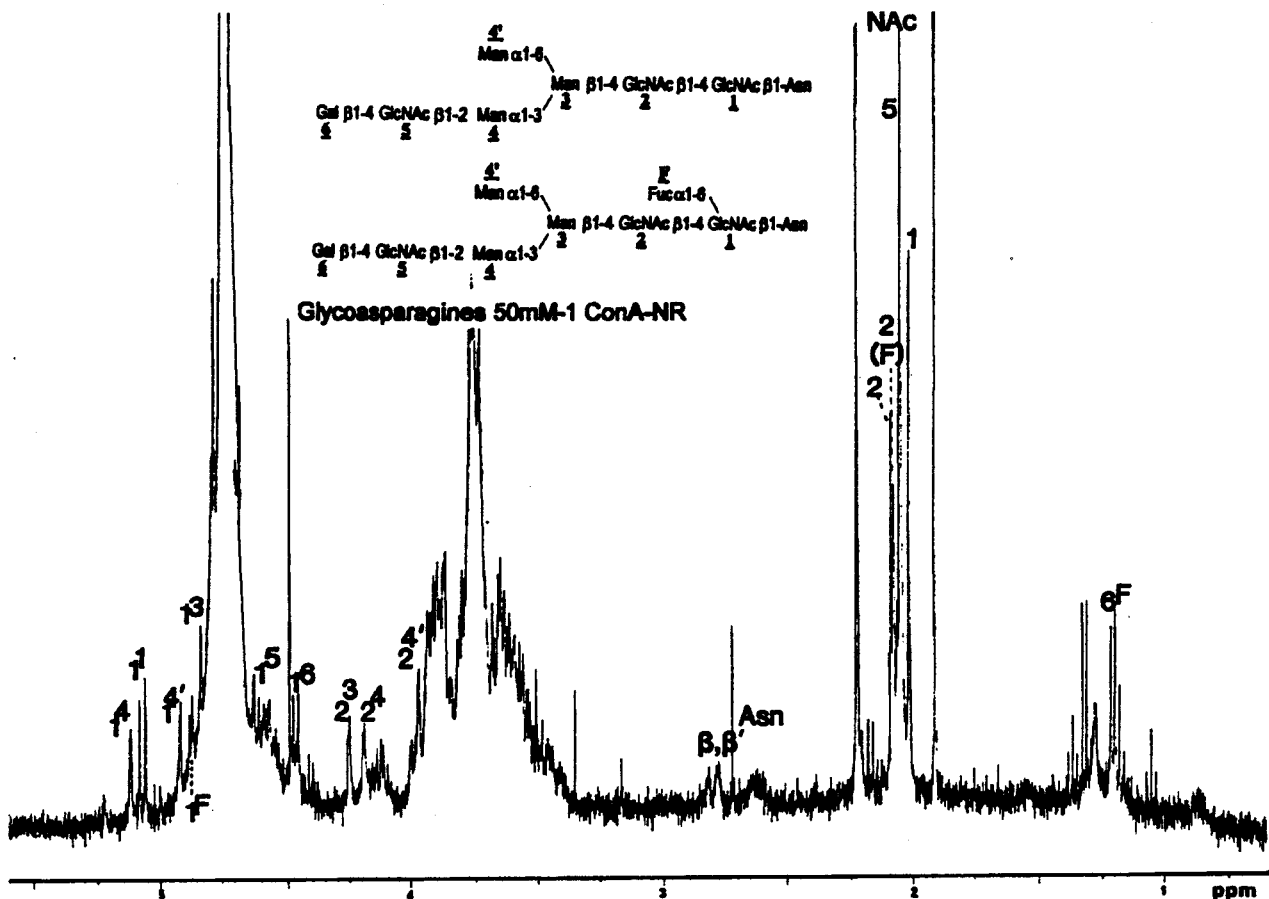
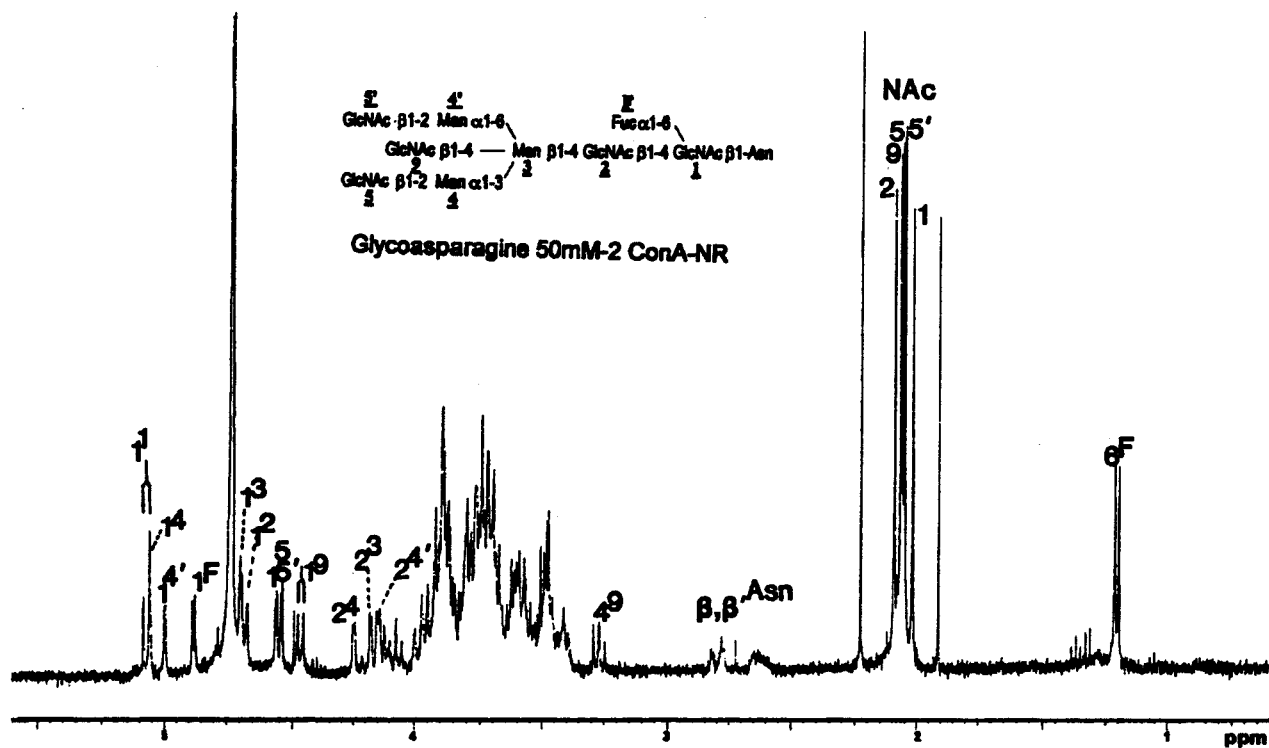


Figure 4.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum of glycosparagines 50mM-1 ConA-NR and 50mM-2 ConA-NR



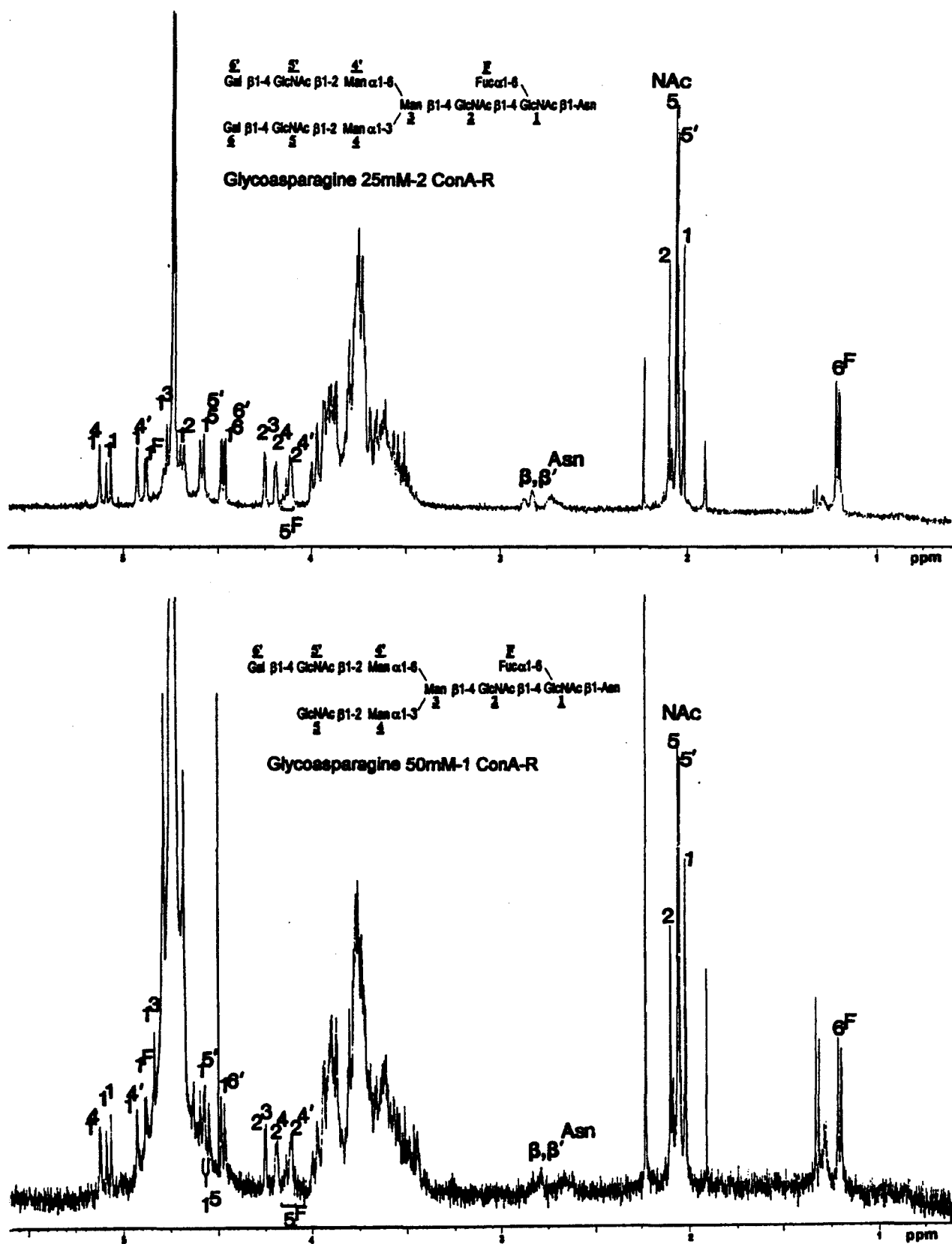


Figure 5.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum of glycoasparagines 25mM-2 ConA-R and 50mM-1 ConA-R

Acknowledgements: This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111: Relation structure-fonction des constituants membranaires; director: Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandre-Artois and by the Ministère de l'Education Nationale. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Ministère de l'Education Nationale and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution in the acquisition of the 400 MHz NMR apparatus.

LES GLYCOLIPIDES

La dernière partie de notre étude a consisté en la caractérisation structurale du matériel glycolipidique dont nous rapportons ci-après la procédure expérimentale et les premiers résultats.

Extraction et purification du matériel glycolipidique

Extraction des glycolipides

L'extraction des glycolipides est conduite sur le culot issu de la centrifugation du matériel méconial aqueux (figure 19, page 78 ; figure 22, page 156). Cette dernière est basée sur la technique de Svennerholm et Fredman (1980). Le culot est homogénéisé dans 3 volumes d'eau. L'homogénat est alors ajouté à 10 volumes de méthanol et 5 volumes de chloroforme, puis maintenu sous agitation constante pendant 30 minutes. Après centrifugation à 2000 tours/minute pendant 10 minutes, le surnageant est sauvegardé et le culot est resuspendu dans 4 volumes d'eau additionnés de 15 volumes de chloroforme/méthanol (1/2, par vol.). Ce mélange est centrifugé durant 10 minutes à 2000 tours/minute et les 2 surnageants lipidiques sont combinés. Le culot protéique délipidé est, quant à lui, resuspendu dans 3 volumes d'eau et lyophilisé avant de subir la β -Elimination non réductive (voir article, pages 80-114).

Purification sur Sephadex LH-20

Le résidu issu de l'évaporation des surnageants lipidiques est soumis à une chromatographie sur colonne de sephadex LH-20 (taille:50x2cm). En utilisant le mélange chloroforme/méthanol/eau (66/33/1, par vol.), les lipides sont élués et les composés non lipidiques contaminants sont retenus (Baumann et al, 1979).

Dégradation alcaline douce

Afin d'éliminer les phospholipides présents dans l'extrait lipidique, ce dernier est soumis à une dégradation alcaline douce basée sur la technique de Karlsson (1987). L'extrait est traité par 50 ml de KOH 0.2 molaire dans le méthanol pendant 3 heures. La potasse est neutralisée par de l'acide acétique et le mélange est transféré dans un boudin à dialyse contenant 60 ml de chloroforme et 40 ml d'eau. Après 4 jours de dialyse contre de l'eau, le contenu du boudin est évaporé.

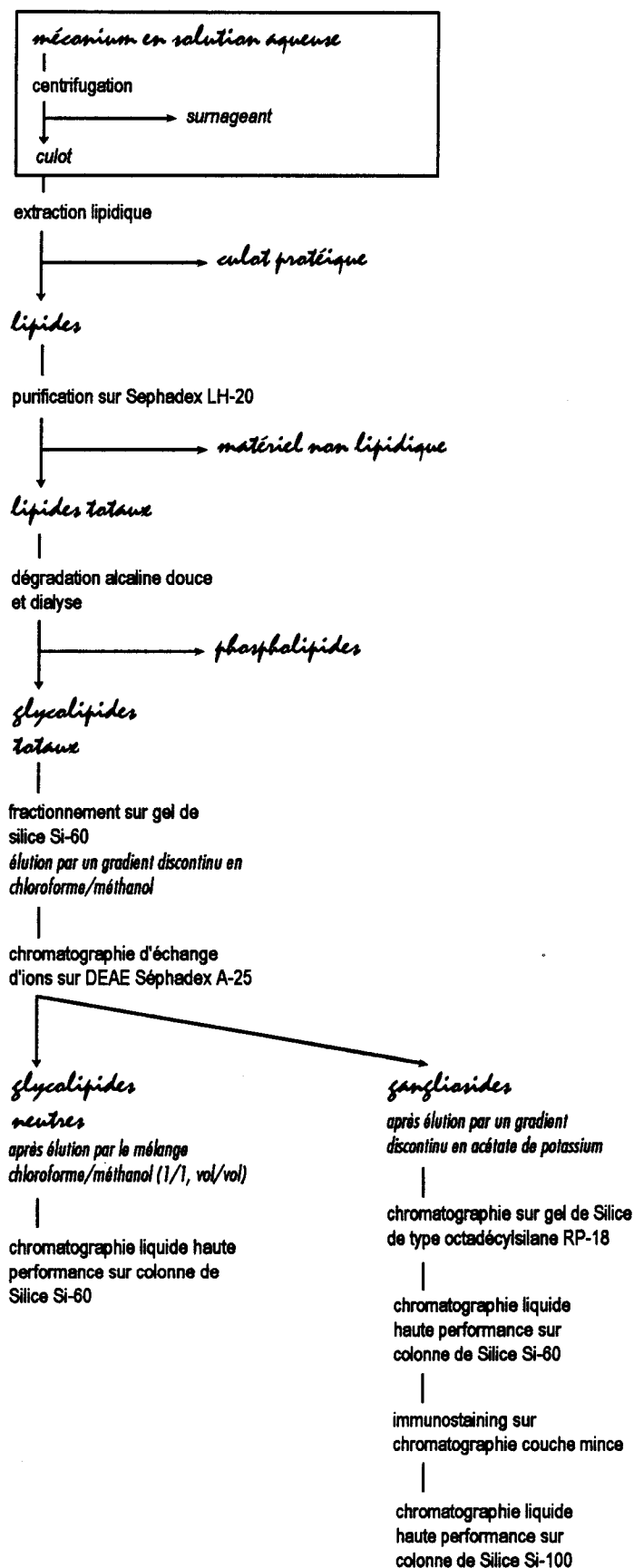


figure 22

schéma de fractionnement des glycolipides du méconium

Fractionnement sur gel de silice Si-60

Le mélange glycolipidique ainsi purifié est chromatographié sur une colonne de silice Si-60 (taille: 30x3cm). L'élution est réalisée par un gradient discontinu en méthanol dans le chloroforme (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50%), méthanol et méthanol/eau (1/1, par vol.). Le résultat de ce fractionnement est montré dans la figure 23 ci-dessous. Dans notre recherche de matériels oligosaccharidiques fucosylés et/ou sialylés, notre intérêt s'est porté sur les fractions supérieures à 25%, que nous avons rassemblées. En effet, compte-tenu du profil d'élution, de la faible migration de ces fractions «supérieures» dans le solvant neutre chloroforme/méthanol/eau (130/50/9, par vol.); ces fractions renferment les glycolipides neutres de forte masse moléculaire ou fucosylés ainsi que les gangliosides. Enfin, l'utilisation de révélateurs spécifiques du fucose: le naphtrésorcinol et de l'acide sialique: le résorcinol, a indiqué la présence de nombreuses bandes positives après chromatographies sur couche mince (résultats non montrés).

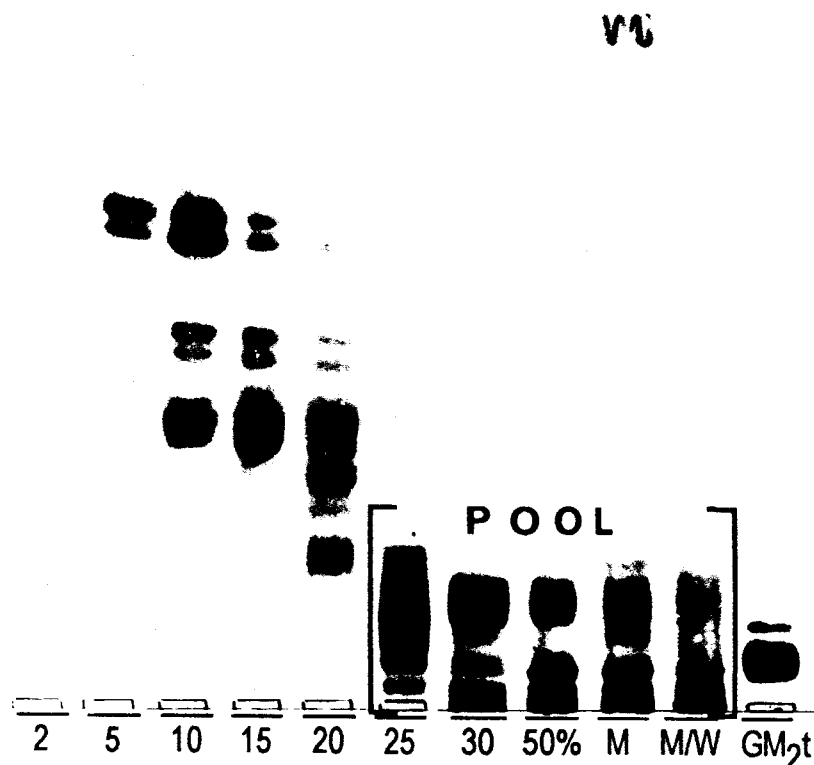


figure 23

chromatographie sur couche mince des glycolipides extraits du méconium, après fractionnement sur gel de silice Si-60.

système solvant: chloroforme/méthanol/eau (130/50/9, par vol.).

réactif de révélation: orcinol sulfurique.

Séparation des matériels neutres et acides sur DEAE-Sephadex A-25

Afin de séparer les glycolipides neutres des gangliosides, une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, taille:12x1.5cm) a été réalisée. Le gel est activé par incubation pendant une nuit dans le mélange chloroforme/méthanol/acétate de potassium 0.8 molaire (40/50/8, par vol.). Avant utilisation, l'excès de sel est éliminé par lavage abondant de la colonne avec le même système solvant sans sel. L'extrait à séparer est appliqué dans le mélange chloroforme/méthanol (1/1, par vol.). Les glycolipides neutres sont élués avec ce même mélange. Les gangliosides sont élués par un gradient discontinu en acétate de potassium méthanolique (0.02, 0.10 et 0.40 molaire). Les 3 fractions ainsi obtenues sont dessalées sur une colonne (taille:12x3cm) de silice hydrophobe de type octadécylsilane RP-18 (Williams et McCluer, 1980).

Fractionnement des glycolipides neutres

L'étape finale de séparation du matériel glycolipidique neutre est conduite par chromatographie liquide haute performance sur phase stationnaire à base de silice non greffée (10µm, LiChrospher Si-60, 250x25mm, Merck) utilisant le mélange isopropanol/hexane/eau comme éluant (Watanabe et Arao, 1981).

Le gradient d'élution utilisé est le suivant:

temps en minutes	isopropanol/hexane/eau (par vol.)
0	55/35/10
90	55/35/10
150	55/30/15
210	55/25/20
255	55/20/25

Le débit est de 4 ml/tube et la taille des fractions collectées est de 3ml/tube.

Le profil d'élution est présenté dans la figure 24 (page 159).

Les fractions renfermant les glycolipides les plus lourds (tubes > 180) ont été rassemblées en 4 familles:

- tubes 180 à 198;
- tubes 199 à 260;

- tubes 261 à 267;

et tubes 271 à 339.

Ces 4 sous-fractions ont été re-fractionnées en chromatographie liquide haute performance sur colonne analytique (5 μ m, LiChrospher Si-100, 250x4mm, Merck). L'élution des glycolipides a été réalisée de manière isocratique avec le système solvant isopropanol/hexane/eau (55/35/10, par vol.), avec un débit de 0.25ml/mn à raison de 0.5ml/tube (résultats non montrés).

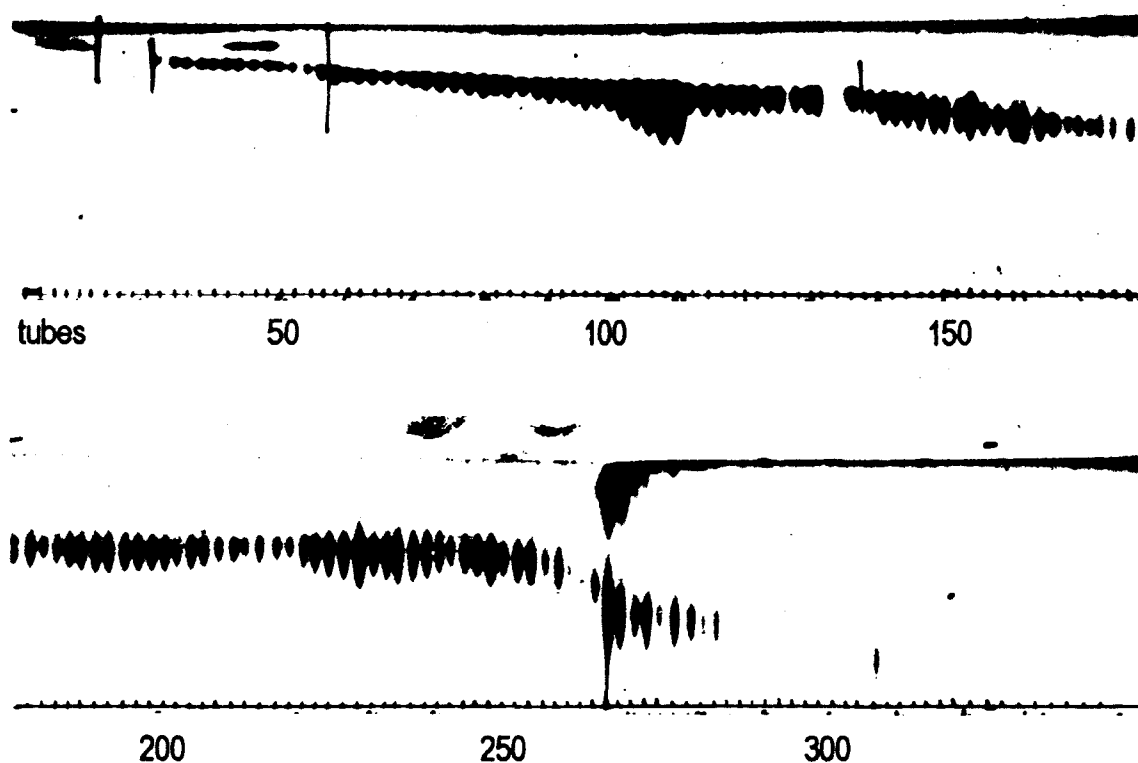


figure 24

profil d'élution du matériel glycolipidique neutre séparé sur LiChrospher Si-60.

système solvant: chloroforme/méthanol/eau (55/45/10, par vol.).

réactif révélateur: orcinol sulfurique.

Fractionnement des gangliosides

Chromatographie Liquide Haute Performance préparative

Comme pour les glycolipides neutres, le fractionnement par chromatographie liquide haute performance des gangliosides a été réalisé sur colonne préparative de silice LiChrospher Si-60. Les conditions expérimentales sont les suivantes:



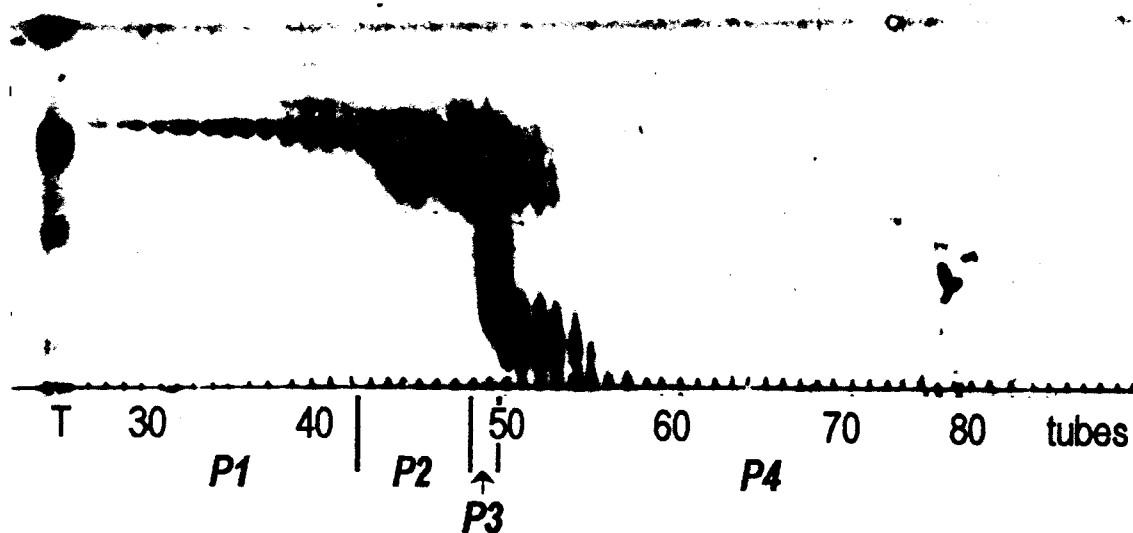
- élution isocratique avec le mélange isopropanol/hexane/eau (55/35/10, par vol.);

- débit: 4ml/mn;

et taille des fractions collectées: 3ml/tube.

Les profils d'élution obtenus pour les fractions 0.02 molaire et 0.10 molaire sont présentés dans la figure 25 ci-après.

Fraction 0.02 molaire



Fraction 0.10 molaire

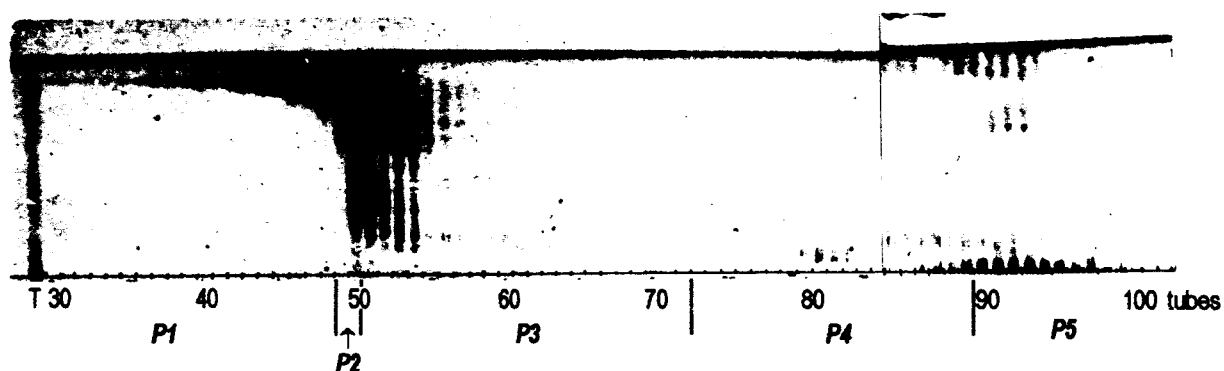


figure 25

profils d'élution des fractions 0.02 et 0.10 molaire séparées sur LiChrospher Si-60.

système solvant: chloroforme/méthanol/CaCl₂ aqueux (55/45/10, par vol.)

réactif révélateur: résorcinol chlorhydrique

T = fraction globale témoin



4 sous-unités ont été rassemblées dans la fraction **0.02 molaire**: 0.02-P1, 0.02-P2, 0.02-P3 et 0.02-P4 (figure 25, page 160) et 5 dans le fraction **0.10 molaire**: 0.10-P1, 0.10-P2, 0.10-P3, 0.10-P4 et 0.10-P5 (figure 25, page 160).

Immunorévélation sur plaque de silice

La technique utilisée est celle de Magnani et al (1980), modifiée par Portoukalian et Bouchon (1986). Après migration des gangliosides, la couche mince est traitée avec du polyisobutylmétacrylate (Aldrich) 0.05% dans l'hexane pendant 1 minute. Le blocage des sites non spécifiques est conduit par traitement de la plaque pendant 30 minutes dans une solution d'albumine à 0.2% dans le PBS. L'anticorps est alors ajouté dans du PBS et, après 1 heure d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée 3 fois avec le même tampon. Le second anticorps, biotinylé (Sigma immunochemicals) dilué au 1/250ème dans le PBS est alors ajouté et l'incubation dure 1 heure. Après 3 lavages avec du PBS, la plaque est incubée pendant 45 minutes dans une solution renfermant le complexe streptavidine/peoxydase biotinylée (Amersham) puis lavée et révélée par une solution de 4-chloro-1-naphtol (Sigma immunochemicals): 1mg de 4-chloro-1-naphtol dissout dans 3 ml de méthanol additionné de 10ml de PBS et 5µl de H₂O₂, jusqu'à l'apparition d'une coloration bleu d'intensité maximale.

Dans notre étude, les anticorps anti-gangliosides (fournis par Jacques Portoukalian, unité 218 INSERM, Lyon) utilisés sont les suivants:

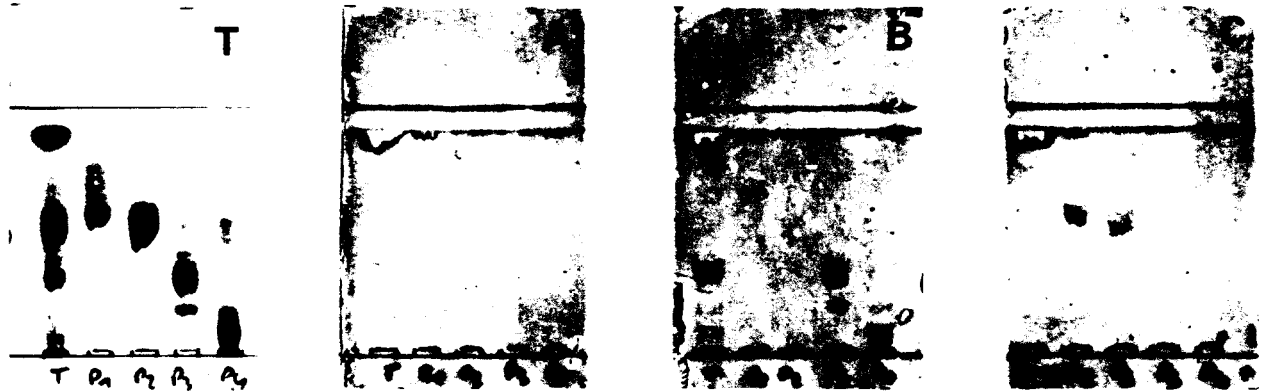
- l'anticorps monoclonal **BBH3** anti-sialyl Lewis^a;

- l'anticorps monoclonal **FH6** anti-sialyl Lewis^x;

et l'anticorps monoclonal **1B9** anti-(NeuAcα2-6Galβ).

Les sous-fractions issues de la chromatographie liquide haute performance préparative des fractions 0.02 molaire et 0.10 molaire ont été testées avec ces anticorps. L'anticorps **BBH3** n'a réagi avec aucune des sous-fractions gangliosidiques indiquant l'absence d'épitopes sialyl-Lewis^a (pistes A- figure 26, page 162). L'anticorps **FH6** a présenté une fixation envers les sous-fractions 0.02-P1 et 0.02-P2 (pistes C- figure 26, page 162). Quant aux nombreuses bandes révélées avec l'anticorps monoclonal **1B9**: sous-fractions 0.02-P3, 0.02-P4, 0.10-P2, 0.10-P3, 0.10-P4 et 0.10-P5 (pistes B- figure 26, page 162), celles-ci attestent de la présence de nombreux gangliosides exprimant l'épitope oncofoetal NeuAcα2-6Galβ.

Fraction 0.02molaire



Fraction 0.10molaire

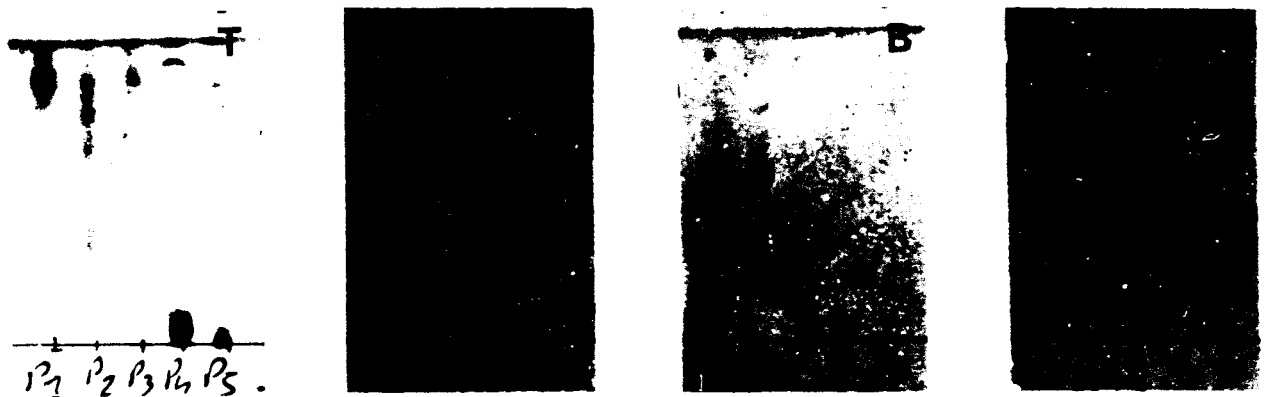


figure 26

immunorévélation sur plaque de silice des sous-fractions obtenues après séparation par chromatographie liquide haute performance préparative.

T, révélation avec le résorcinol chlorhydrique;

A, immunorévélation avec l'anti-sialyl Lewis^a **BBH3**;

B, immunorévélation avec l'anti-(NeuAc α 2-6Gal β) **1B9**;

C, immunorévélation avec l'anti-sialyl Lewis^x **FH6**.

système solvant: chloroforme/méthanol/CaCl₂ aqueux (55/45/10, par vol.)



Traitement des gangliosides par neuraminidase

Après migration des gangliosides sur plaque de silice, celle-ci est traitée pendant 1 minute dans le polyisobutylmétacrylate 0.05% dans l'hexane, puis incubée pendant 30 minutes dans une solution de CaCl_2 à 0.22%. L'enzyme à 0.1U/ml est ajoutée et, après une nuit d'incubation à 37°C, la plaque est lavée par du PBS. Les glycolipides neutres correspondant aux gangliosides hydrolysés sont ensuite immunorévélés à l'aide de l'anticorps monoclonal **1B2** anti-(Gal β 1-4GlcNAc) selon la technique décrite dans le paragraphe précédent. Les résultats obtenus (non montrés) ont indiqué que les bandes positives avec l'anticorps **1B9** l'étaient aussi avec l'anticorps **1B2** après désialylation. Ainsi, les sous-fractions 0.02-P3,P4 et 0.10-P2,P3,P4,P5 (pistes B- figure 26, page 162) possèdent-elles de nombreux épitopes de type 2 NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β .

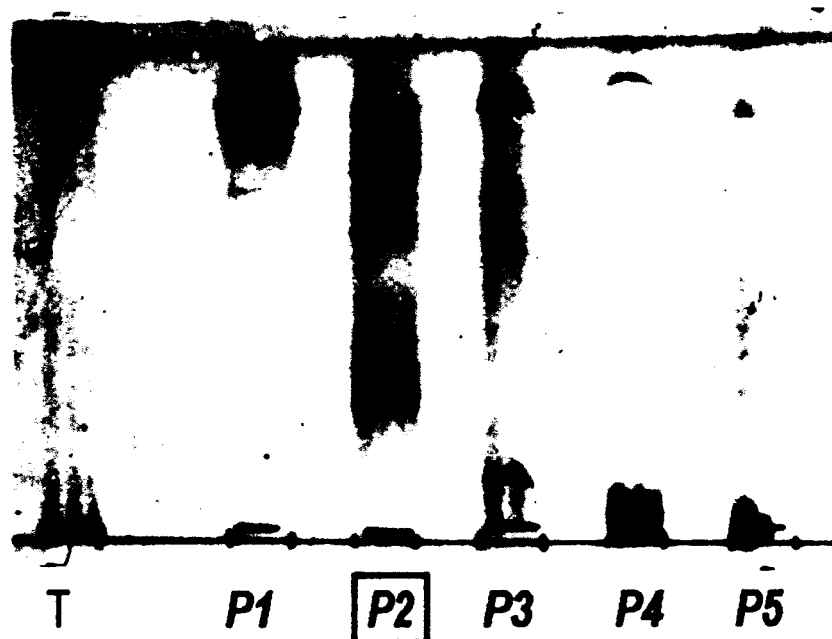
Chromatographie liquide haute performance analytique

Les 9 sous-fractions obtenues après chromatographie liquide haute performance sur colonne préparative (figure 25, page 160) ont été sub-fractionnées sur colonne analytique (5 μ m, LiChrospherSi-100, 250x4mm, Merck). L'élution des gangliosides a été réalisée de façon isocratique avec le système solvant isopropanol/hexane/eau (55/35/10, par vol.), avec un débit de 0.25ml/mn à raison de 0.5ml/tube. L'exemple de la sous-fraction 0.10-P2 est montré dans la figure 27 (page 164).

Analyse des glycolipides en résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz

Conditions expérimentales

Dans un premier temps, les échantillons ont été échangés 1 fois avec du D_2O (99.96% atomes D, CEA) puis lyophilisés. Ils sont ensuite repris par 0.5ml d'un mélange de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (98/2, par vol.) contenant 0.1% de tétraméthylsilane (TMS). Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre Bruker AM-400 WB piloté par un ordinateur Aspect 3000, avec une sonde mixte $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (DUAL) pour des tubes de 5 mm. Les expériences sont réalisées à 60°C pour déplacer le signal d'eau résiduelle dans une région moins importante du spectre (δ # 3.25 ppm). Les spectres 1-D et 2-D (COSY homonucléaires) sont obtenus avec les programmes standards de la librairie Bruker (10 ppm pour 32K et 2K points, respectivement). Les déplacements chimiques (δ en ppm) sont exprimés par rapport au signal du TMS ($\delta = 0.0$ ppm) dans toutes les expériences.



Fraction 0.10molaire

après HPLC préparative sur LiChrospher Si-60

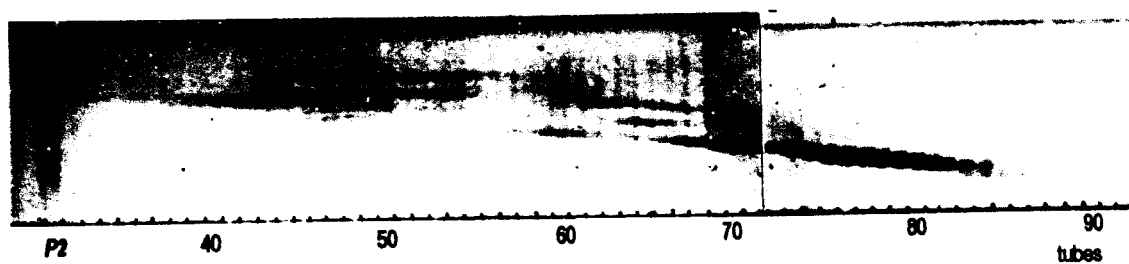


figure 27

profil d'éluion de la sous-fraction 0.10-P2 sub-fractionnée par chromatographie liquide haute performance sur colonne analytique LiChrospher Si-100

système solvant: chloroforme/méthanol/CaCl₂ aqueux (55/45/10, par vol.)

réactif révélateur: résorcinol chlorydrique



Résultats

Les structures primaires de 6 glycolipides neutres ont été établies par spectroscopie RMN. L'analyse des spectres du proton a été faite par comparaison avec les données de la littérature. Ces glycolipides possèdent tous une unité lactose caractérisée par les signaux des protons anomériques observés pour δ H-1 # 4.28 à 4.29 ppm (β Gal) et δ H-1 # 4.20 à 4.22 ppm (β Glc) (figures 28 à 31).

Glycolipide t76/87 (fraction rassemblant les tubes 76 à 87 issus de la chromatographie liquide haute performance sur LiChrospher Si-60; voir figure 24, page 159).

Le spectre RMN 1D du proton (figure 28, page 171 et tableau 24, page 167) montre la présence d'un doublet à 5.014 ppm possédant une constante de couplage $^3J_{1,2}$ inférieure à 3Hz, caractéristique d'une unité de fucose liée en α 1-2 sur du galactose. En effet, la résonance de Fuc H-5 est observée à $\delta = 4.094$ ppm et le proton anomérique du galactose IV est déblindé à 4.460 ppm. Le glissement chimique de GlcNAc H-1 à 4.620 ppm est typique d'une chaîne N-Acétyllactosaminique de type 1 (Dabrowski et al,1982). En conséquence, la structure de la partie glycanique du glycolipide t76/87 a été établie comme suit:

Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ou **antigène H-5-1**.

Glycolipide t95/100, t128/138 (voir figure 24, page 159)

Ce composé possède une composition glucidique identique au précédent (1 Fuc, 2 Gal, 1 GlcNAc, 1 Glc). L'analyse de spectroscopie RMN (figure 28, page 171) montre la présence d'un résidu de fucose dont les résonances des protons H-1 ($\delta = 4.808$ ppm) et H-5 ($\delta = 4.566$ ppm) sont caractéristiques du déterminant Lewis^a. Les valeurs observées (tableau 25, page 167) sont en accord avec les données de la littérature (Dabrowski et al,1982) et permettent de définir la structure suivante:

Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ou **antigène Le^a-5**.

Glycolipide t155/165 (voir figure 24, page 159)

Le spectre RMN (figure 28, page 171 et figure 29, page 172) met en évidence la présence de deux unités de fucose (δ H-1 = 4.782 et 4.932 ppm) respectivement liés en α 1-4 sur GlcNAc III et en α 1-2 sur Gal IV. Leurs protons H-5 résonnent respectivement à $\delta = 4.602$ ppm et 4.207 ppm. L'ensemble de ces paramètres (tableau 26, page 168) est caractéristique du déterminant Lewis^b (Dabrowski et al,1982):

Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ou **antigène Le^b-6**.

Glycolipide t180/198 (t31/33), t199/260 (t30/31) (correspondant aux tubes 31 à 33 de la fraction t180/198 re-fractionnée par chromatographie liquide haute performance sur LiChrospher Si-100, et aux tubes 30 à 31 de la fraction 199/260; voir *le fractionnement des glycolipides neutres*, pages 158-159).

L'analyse du spectre RMN du glycolipide t180/198 (t31/33), t199/260 (t30/31) montre, par rapport au spectre précédent, la présence d'un proton anomérique α supplémentaire et le déblindage du proton anomérique du fucose lié en α 1-2. La présence d'un résidu additionnel d' α GalNAc peut être établie par l'observation d'un groupement acétamido résonant à 1.852 ppm (figure 28, page 171). Ce glycolipide peut être considéré comme une extension par une unité GalNAc du précédent, conduisant au déterminant de groupe sanguin **A.Lewis^b**: GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc dont les paramètres (tableau 27, page 169) sont conformes à ceux établis par Clausen et al (1985b).

Glycolipide t33/53

Ce composé a été identifié à l'antigène **p^k** ou globotriaosylcéramide sur la base de son spectre RMN (figure 30, page 173 et figure 31, page 174) grâce à la résonance caractéristique du proton H-1 du résidu terminal d' α Gal à $\delta = 4.817$ ppm. Les valeurs des glissements chimiques (tableau 28, page 170) sont en tout point identiques à celles trouvées par Dabrowski et al (1982). La structure s'établit donc comme suit:



Glycolipide t55/57

Le spectre RMN de ce composé montre, par rapport au précédent, l'apparition d'un doublet caractéristique ($\delta = 4.546$ ppm) correspondant au proton H-1 d'une β GalNAc terminale (figure 30, page 173 et tableau 29, page 170). La présence de ce résidu GalNAc a été corroborée par l'observation du groupement acétamido résonant à 1.865 ppm. Sur la base de ces observations, ce glycolipide a pu être identifié à l'homologue supérieur du Gb₃ précédent, c'est à dire le Gb₄ ou **globoside**:

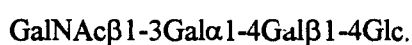


tableau 24

glissements chimiques des protons du glycolipide t76/87 ou antigène H-5-1.

	glissements chimiques de				
	F²	IV	III	II	I
	Fuc α 1-2	Gal β 1-3	GlcNAc β 1-3	Gal β 1-4	Glc β 1
ppm					
H-1	5.014	4.460	4.620	4.285	4.228
H-5	4.094	nd	nd	nd	nd
CH ₃	1.073	-	-	-	-
N-Ac	-	-	1.844	-	-

nd = non déterminé

tableau 25

glissements chimiques des protons du glycolipide t95/100 ou antigène Le^a-5.

	glissements chimiques de				
	IV	F⁴	III	II	I
	Gal β 1-3	(Fuc α 1-4)	GlcNAc β 1-3	Gal β 1-4	Glc β 1
ppm					
H-1	4.337	4.808	4.790	4.287	4.220
H-5	nd	4.566	nd	nd	nd
CH ₃	-	1.032	-	-	-
N-Ac	-	-	1.840	-	-

nd = non déterminé

tableau 26

glissements chimiques des protons du glycolipide t155/165 ou antigène Le^b-6.

glissements chimiques de						
	F²	IV	F⁴	III	II	I
	Fu α 1-2	Gal β 1-3	(Fu α 1-4)	GlcNAc β 1-3	Gal β 1-4	Glc β 1
ppm						
H-1	4.932	4.544	4.782	4.652	4.292	4.207
H-2	3.503	3.485	3.503	3.599	3.450	3.046
H-3	3.626	3.494	3.626	3.959	3.450	3.354
H-4	nd	3.72	nd	nd	3.87	nd
H-5	4.207	nd	4.602	nd	nd	nd
H-6	-	nd	-	nd	nd	nd
CH ₃	1.088	-	1.097	-	-	-
N-Ac	-	-	-	1.843	-	-

nd = non déterminé

tableau 27

glissements chimiques des protons du glycolipide t180/198 (t31-33); t199/260 (t30/31) ou antigène A.Le^b.

glissements chimiques de							
	V	F ²	IV	F ⁴	III	II	I
	GalNAc α -1-3	Fuc α -1-2	Gal β -1-3	(Fuc α -1-4)	GlcNAc β -1-3	Gal β -1-4	Glc β -1
ppm							
H-1	5.054	5.081	4.610	4.778	4.652	4.286	4.224
H-5	nd	4.209	nd	4.542	nd	nd	nd
CH ₃	-	1.115	-	1.128	-	-	-
N-Ac	1.852	-	-	-	1.846	-	-

nd = non déterminé

tableau 28

glissements chimiques des protons du glycolipide t33/53 ou antigène p^k.

	glissements chimiques de		
	III	II	I
	Gal α 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1
	ppm		
H-1	4.817	4.281	4.227
H-2	3.661	3.318	3.046

tableau 29

glissements chimiques des protons du glycolipide t55/57 ou globoside (antigène P).

	glissements chimiques de			
	IV	III	II	I
	GalNAc β 1-3	Gal α 1-4	Gal β 1-4	Glc β 1
	ppm			
H-1	4.546	4.838	4.285	4.229
N-Ac	1.865	-	-	-

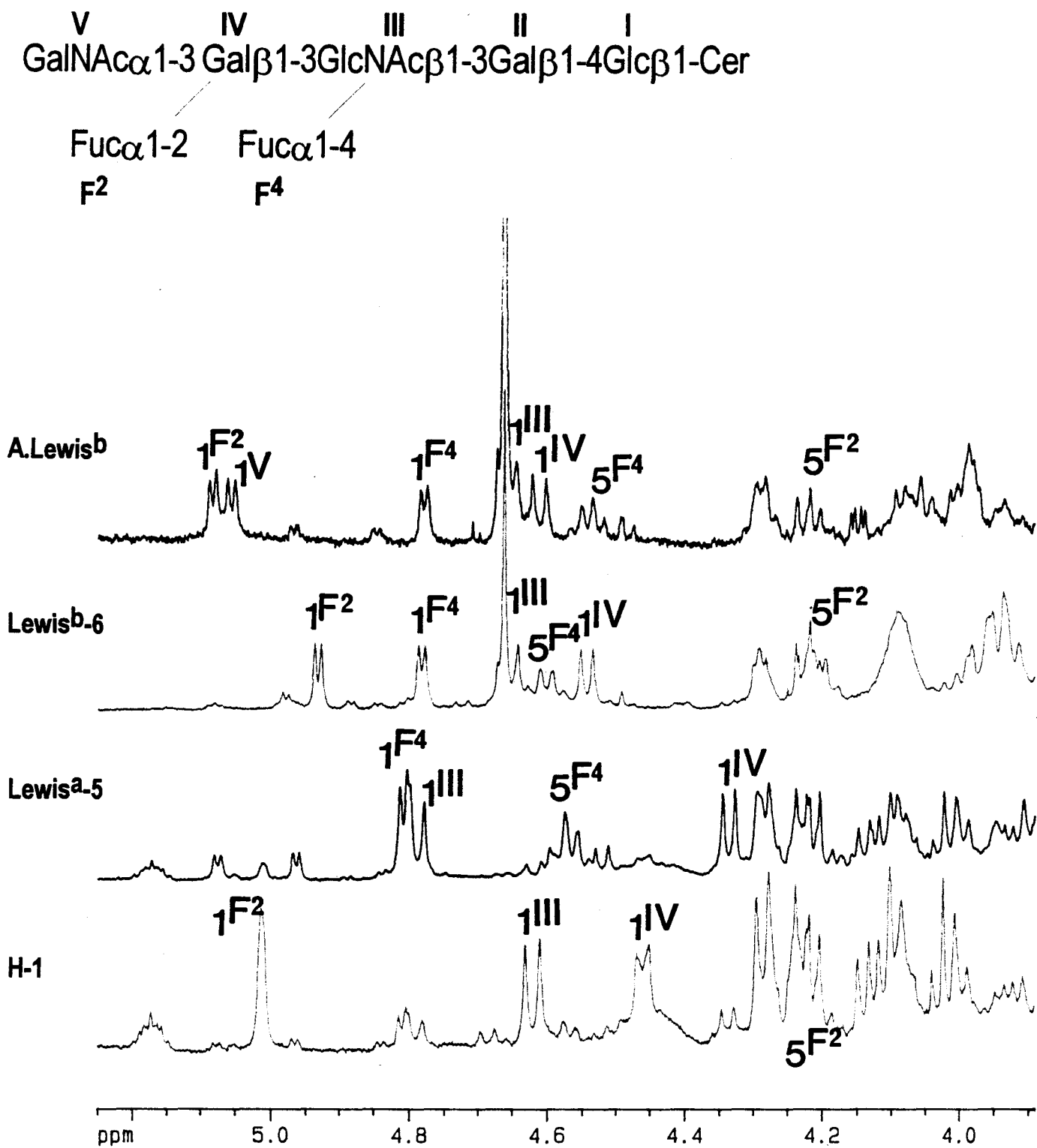


figure 28

extension de la région anomérique des spectres RMN ¹H des antigènes glycolipidiques H-1, Lewis^a, Lewis^b et A.Lewis^b.



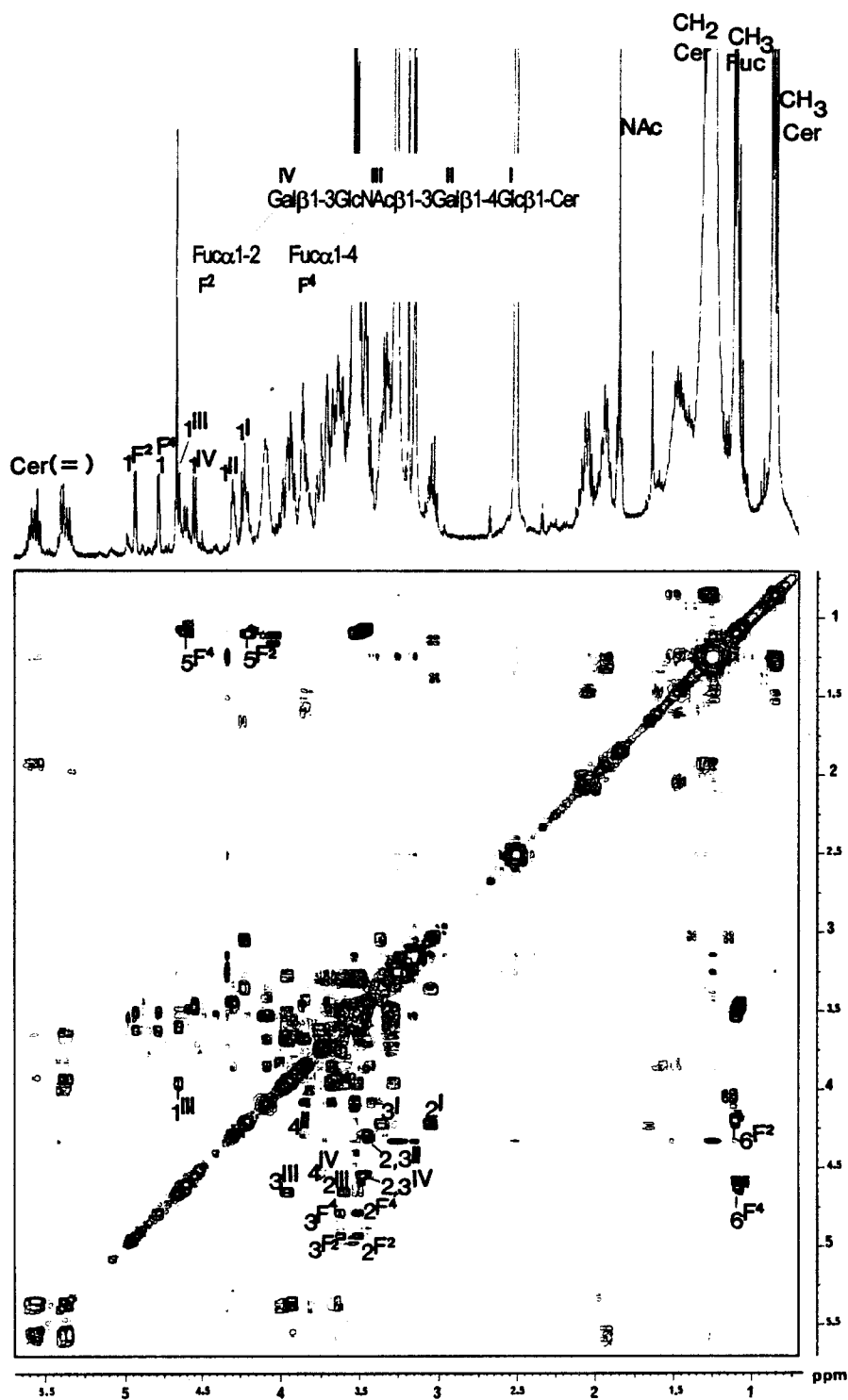


figure 29

spectre COSY double-relai (COSY DR) de l'antigène glycolipidique Lewis^b.

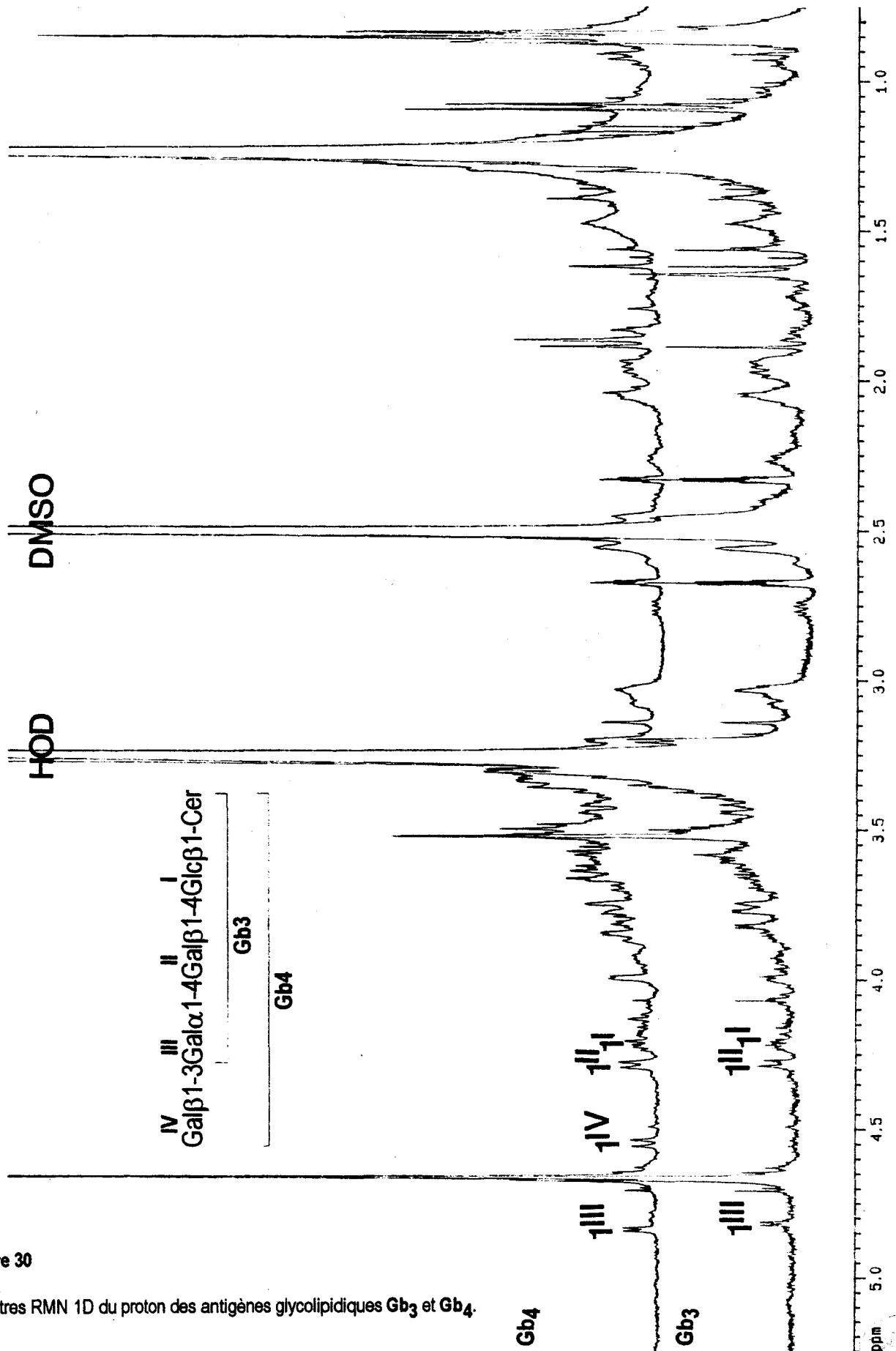


figure 30

spectres RMN 1D du proton des antigènes glycolipidiques Gb₃ et Gb₄.



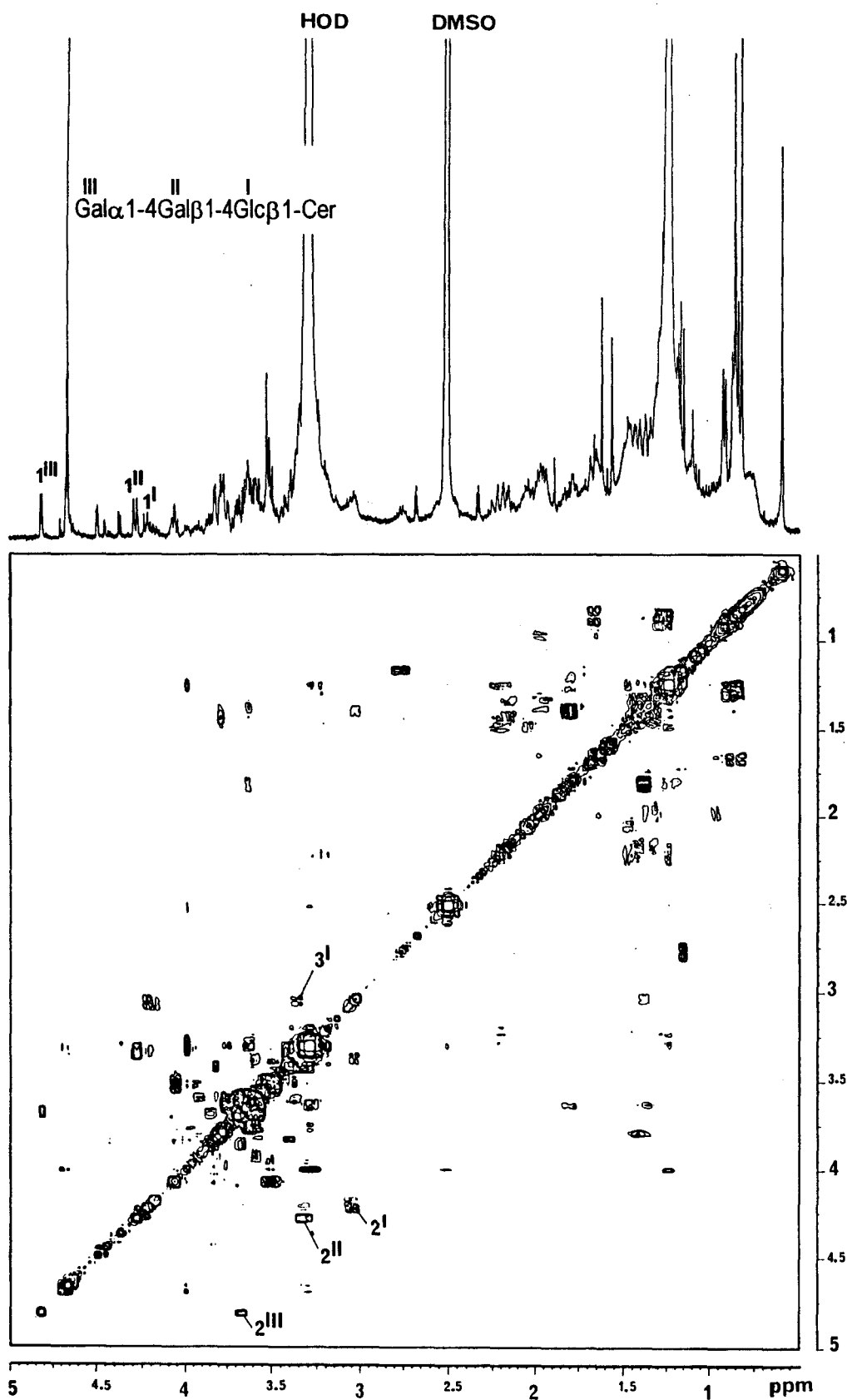


figure 31

spectre COSY 90 de l'antigène glycolipidique Gb₃.

Discussion

L'analyse du matériel glycolipidique méconial par spectroscopie RMN n'a permis l'élucidation structurale que de six antigènes. Il faut savoir que cette étude est rendue difficile par le peu de données disponibles dans la littérature concernant la RMN des glycolipides. Il est donc nécessaire de disposer de quantités importantes de matériel (de l'ordre de quelques milligrammes au minimum), qui seules autorisent des analyses permettant l'attribution complète de tous les paramètres nécessaires à l'établissement d'une structure glycanique. Ainsi, les six structures décrites ici correspondent-elles donc à des glycolipides neutres, lesquels sont pondéralement prépondérants dans le méconium. Ces structures ont toutes été rapportées précédemment dans le méconium (Karlsson et Larson, 1981), exception faite de l'antigène A.Lewis^b qui y est décrit pour la première fois. Basés sur une unité N-Acétyllactosaminique de type 1, ces antigènes H, Lewis^a, Lewis^b et A.Lewis^b sont également des constituants classiques de l'épithélium intestinal adulte (McKibbin et al, 1982; Bjork et al, 1987).

Puisque leur analyse en résonance magnétique nucléaire est difficile, les autres glycolipides neutres mineurs ainsi que les gangliosides sont actuellement en cours d'analyse par spectroscopie de masse. Néanmoins, s'agissant du matériel gangliosidique, quelques indications structurales nous ont été fournies par l'approche immunochimique:

- ☛ En premier lieu, nous avons détecté l'antigène oncofoetal sialyl-Lewis^x (révélation positive avec l'anticorps monoclonal FH6);
- ☛ deuxièmement, le méconium est un milieu extrêmement riche en gangliosides possédant l'épitope NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc comme nous l'ont montré les immunorévélations réalisées avec les anticorps monoclonaux 1B9 et 1B2. Comme il a été discuté dans le chapitre précédent, ces séquences sont fortement associées à la cancérisation et les analyses réalisées par spectrométrie de masse devraient confirmer la nature oncofoetale de ces antigènes.

Quant au matériel de nature neutre, les fractions restant à étudier doivent renfermer des glycolipides de masse moléculaire élevée ou polyfucosylés (peut être de nature polylactosaminique). En effet, ceux-ci présentent des distances de migration sur couche mince extrêmement faibles, même dans le solvant chloroforme/méthanol/CaCl₂ aqueux (55/45/10, par vol.) spécifique des gangliosides.

CONCLUSION

Nos études ont confirmé l'intérêt du méconium humain en tant que source pour la préparation d'oligosaccharides doués d'activité antigénique, de groupe sanguin ou reliés aux antigènes onco-foetaux présents à la surface des cellules transformées. Les principaux types de glycoconjugués sont représentés dans le méconium: mucines, glycolipides et oligosaccharides libres.

Les chaînes oligosaccharidiques des **mucines** méconiales ont été bien étudiées par différents groupes. Bon nombre d'antigènes onco-foetaux ont été localisés dans ces chaînes O-glycanniques tels que les antigènes Le^X , sialyl- Le^X . Ces antigènes présentant un intérêt certain dans l'immunodiagnostic des tumeurs ou d'autres recherches (sélectines, par exemple), notre démarche a principalement consisté en la mise au point d'une méthode de libération des chaînes glycanniques des mucines (β -Elimination non réductive) permettant d'obtenir des oligosaccharides natifs. Ces oligosaccharides sont directement utilisables dans la synthèse de néo-glycoconjugués (néoglycolipides ou néoglycoprotéines) par le procédé d'amination réductive. Plusieurs oligosaccharides ont pu être ainsi isolés et caractérisés, porteurs notamment de l'épitope Lewis X . Cette méthode de β -Elimination non réductive s'avère donc être une alternative de choix face à l'hydrazinolyse douce, pour la libération des O-glycannes et la préparation à grande échelle d'oligosaccharides d'intérêt biologique.

Tout comme les chaînes glycanniques des mucines, les **glycolipides** sont porteurs d'antigènes associés aux tumeurs aisément caractérisables à l'aide d'anticorps monoclonaux. Le méconium se caractérise par une très grande diversité en glycolipides, rendant leur séparation malaisée. Nous avons contribué à introduire au Laboratoire les principales techniques nécessaires (notamment HPLC) à leur séparation et leur isolement. Cette technologie nous a permis d'isoler plus d'une cinquantaine d'entités différentes. L'obtention de ces modèles glycolipidiques nous a également permis d'aborder leur étude par différentes méthodes physico-chimiques comme la RMN et la spectrométrie de masse. D'un point de vue antigénique, la plupart des glycolipides isolés à ce jour sont porteurs d'épitopes de groupe sanguin sur une chaîne de type 1. Ces constituants sont des marqueurs classiques de l'épithélium intestinal. La structure A Lewis b décrite dans le mémoire est rapportée pour la première fois dans le méconium. L'analyse structurale en cours est focalisée sur les constituants neutres de haute masse moléculaire que nous avons mis en évidence. Ces composés riches en fucose sont vraisemblablement de nature polylactosaminique. Les gangliosides, quant à eux, réagissent avec des anticorps spécifiques dirigés contre les déterminants sialyl-Lewis X et l'épitope tumoral NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc. L'étude de ces

constituants abordée en spectrométrie de masse s'avère particulièrement intéressante et devrait nous confirmer la nature associée aux tumeurs de ceux-ci.

L'intérêt de l'étude des **oligosaccharides libres** et des **glycoasparagines** réside dans le fait qu'ils trouvent leur origine dans le processus catabolique des glycoconjugués du tractus intestinal foetal. L'analyse détaillée de ces composés suggère l'existence d'activités enzymatiques particulières au niveau de l'intestin foetal, notamment une endo- β -galactosidase capable d'hydrolyser les séquences polylactosaminiques. Une telle enzyme n'a jusqu'alors été caractérisée que dans les microorganismes bactériens. L'existence d'une activité endo- β -N-Acétylhexosaminidasiqque similaire à celle décrite dans le cytosol de foie de Rat, ou d'une chitobiase lysosomale peut être également avancée. Au niveau de ces oligosaccharides libres sont également retrouvés des marqueurs qui semblent hautement spécifiques des glycoconjugués de l'intestin tels que l'épitope GlcNAc α 1-4Gal et la N-Acétylglucosamine intercalaire.

En conclusion, nous dirons que nos études bien que fragmentaires se sont étendues à toutes les formes de glycoconjugués présents dans le méconium de Nouveau-né humain. Elles ont permis de confirmer l'intérêt évident de ce milieu biologique pour la préparation à grande échelle de chaînes oligosaccharidiques reliées aux antigènes trouvés à la surface des cellules transformées. Elles nous ont permis de mettre l'accent sur la grande hétérogénéité des glycolipides, qui représentent sans équivoque les substances les plus intéressantes, antigéniquement parlant. L'étude des composés de haut poids moléculaire ou acides permettra de définir sans nul doute de nouveaux antigènes associés aux tumeurs. Ces études ont en dernier lieu ouvert un champ nouveau d'investigations qu'est celui du catabolisme des glycoconjugués de l'intestin foetal. Ces processus devraient faire intervenir des activités enzymatiques non encore caractérisées dans les tissus différenciés.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abe K, McKibbin JM, Hakomori S (1983) The monoclonal antibody directed to difucosylated type 2 chain (Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc; Y determinant). *J Biol Chem* 258, 11793-7

Abe K, Hakomori S, Ohshiba S (1986) Differential expression of difucosyl type 2 chain (Le^Y) defined by monoclonal antibody AH6 in different locations of colonic epithelia, various histological types of colonic polyps, and adenocarcinomas. *Cancer Res* 46, 2639-44

Agresti R, Alzani R, Andreola S, Bedini V, Giani S, Ménard S, Rilke F, Colnaghi MI (1988) Histopathological characterization of a novel monoclonal antibody, MLC1, reacting with lung carcinomas. *Tumori* 74, 401-10

Angström J, Falk KE, Karlsson KA, Larson G (1982) Chemical fingerprinting of non-acid glycosphingolipids in meconium of a human individual of blood group B Le(a-b+) and secretor. *Biochim Biophys Acta* 712, 274-82

B

Basu S, Basu M, Chien JL, Presper KA (1980) Biosynthesis of gangliosides in tissues. In *Structure and function of gangliosides* (Svennerholm L, Dreyfus H and Urban PF, eds). Plenum Press, New York, 213-26

Battifora H, Sorensen HR, Mehta P, Ahn C, Niland J, Hage E, Pettijohn DE, Olsson L (1992) Tumor-associated antigen 43-9F is of prognostic value in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 70, 1867-72

Bauman H, Nudelman E, Watanabe K, Hakomori S (1979) Neutral fucolipids and fucogangliosides of rat hepatoma HTC and H35 cells, rat liver, and hepatocytes. *Cancer Res* 39, 2637-43

Bergh EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL (1991) A carbohydrate domain common to both sialyl Le^a and sialyl Le^x is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 266, 14869-72

Bierhuizen MFA, Edzes HT, Schiphorst WECM, Van Den Eijnden DH, Van Dijk W (1988) Effect of α (2-6) linked sialic acid and α (1-3) linked fucose on the interaction of N-linked glycopeptides

and related oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin (L-PHA). Glycoconjugate J 5, 85-97

Bjork S, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Leffler H (1987) Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. J Biol Chem 262, 6758-65

Blaszczyk M, Ross AH, Ernst CS, Marchisio M, Atkinson BF, Pak KY, Steplewski Z, Koprowski (1984) A fetal glycolipid expressed on adenocarcinomas of the colon. Int J Cancer 33, 313-8

Bremer EG, Levery SB, Sonnino S, Ghidoni R, Canevari S, Kannagi R, Hakomori S (1984) Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. J Biol Chem 259, 14773-7

Brezicka FT, Olling S, Nilsson O, Bergh J, Holmgren J, Sörenson S, Yngvasson F, Lindholm L (1989) Immunohistological detection of fucosyl-GM₁ ganglioside in human lung cancer and normal tissues with monoclonal antibodies. Cancer Res 49, 1300-5

Brockhaus M, Magnani JL, Herlyn M, Blaszczyk M, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1982) Monoclonal antibodies directed against the sugar sequence of lacto-N-fucopentaose III are obtained from mice immunized with human tumors. Arch Biochem Biophys 217, 647-51

Brockhaus M, Wysocka M, Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1985) Normal salivary mucin contains the gastrointestinal cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the serum mucin of patients. Vox Sang 48, 34-8

Brockhausen I, Matta KL, Orr J, Schachter H (1985) Mucin synthesis. UDP-GlcNAc:GalNAc-R β 3-N-acetylglucosaminyltransferase and UDP-GlcNAc:GlcNAc β 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) β 6-N-acetylglucosaminyltransferase from pig and rat colon mucosa. Biochemistry 24, 1866-74

Brown A, Ellis IO, Embleton MJ, Baldwin RW, Turner DR, Hardcastle JD (1984) Immunohistochemical localization of H hapten and the structurally related H type-2 blood-group antigens on large-bowel tumors and normal adult tissues. Int J Cancer 33, 727-36

Buchbinder L (1935) Heterophile phenomena in immunology. Arch Pathol 19, 841-80

Burtin P, Chavanel G, Hirsch-Marie H (1973) Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA. J Immunol 111, 1926-8

Cahan LD, Irie RF, Singh R, Cassidenti A, Paulson JC (1982) Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7629-33

Capon C, Leroy Y, Wieruszkeski JM, Ricart G, Strecker G, Montreuil J, Fournet B (1989) Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins. *Eur J Biochem* 182, 139-52

Carlson DM (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J Biol Chem* 243, 616-26

Carlson DM, Mc Guire EJ, Jourdian GN, Roseman S (1973) The sialic acids. XVI. Isolation of a mucin sialyltransferase from sheep submaxillary gland. *J Biol Chem* 248, 5763-73

Carubia JM, Yu RK, Macala LJ, Kirkwood JM, Varga JM (1984) Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 500-4

Chai W, Hounsell EF, Cashmore GC, Rosankiewicz JR, Bauer CJ, Feeney J, Feizi T, Lawson AM (1992) Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. A combined mass spectroscopy and ¹H-NMR study. *Eur J Biochem* 203, 257-68

Chandrasekaran EV, Rana SS, Davila M, Mendicino J (1984) Structures of the oligosaccharide chains in swine trachea mucin glycoproteins. *J Biol Chem* 259, 12908-14

Cheresh DA, Harper JR, Schulz G, Reisfeld RA (1984a) Localization of the gangliosides GD₂ and GD₃ in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5767-71

Cheresh DA, Varki AP, Varki NM, Stallcup WB, Levine JL, Reisfeld RA (1984b) A monoclonal antibody recognizes an O-acetylated sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside. *J Biol Chem* 259, 7453-9

Cheresh DA, Reisfeld RA, Varki AP (1984c) O-acetylation of disialoganglioside GD₃ by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 225, 844-6

Cheresh DA, Rosenberg J, Mujoo K, Hirschowitz L, Reisfeld R (1986) Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD₂, a relevant target antigen on small cell carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytolysis. *Cancer Res* 46, 5112-8

Cheung NV, Saarinen UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia P (1985) Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 45, 2642-9

Cheung NV, Lazarus H, Miraldi F, Abramowsky CR, Kallick S, Saarinen UM, Spitzer T, Strandjord SE, Coccia PF, Berger NA (1987) Ganglioside GD₂ specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patient with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* 5, 1430-40

Cheung NV, Usmani N, Cordon-Cardo C, Houghton AN, Biedler J, Oettgen HF (1989) Monoclonal antibody detection of ganglioside expression in human neuroblastoma. In *Gangliosides and cancer* (Oettgen HF, ed). Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 103-8

Chia D, Terasaki PI, Suyama N, Galton J, Hirota M, Katz D (1985) Use of monoclonal antibodies to sialylated Lewis^x and sialylated Lewis^a for serological tests of cancer. *Cancer Res* 45, 435-7

Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S (1985a) Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood-group A₁-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A₁ and A₂ distinction. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1199-203

Clausen H, Lavery SB, McKibbin JM, Hakomori S (1985b) Blood group A determinants with mono- and difucosyl type 1 chain in human erythrocyte membranes. *Biochemistry* 24, 3578-86

Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer, Hakomori S (1988) Monoclonal antibodies directed to the blood group A associated structure, galactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. *Mol Immunol* 25, 199-204

Colcher D, Hand PH, Nuti M, Schlom J (1982) A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3199-203

Cordon-Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, Sheinfeld J, Fair WR, Old LJ, Melamed MR (1988) Blood group-related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, Le^x, and Le^y determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res* 48, 4113-20

Côté RH (1970) Human sources of blood group substances. In *Blood and tissue antigens* (Aminoff D, ed). Academic Press, New York and London, 249-59

Côté RH, Valet JP (1976) Isolation, composition and reactivity of the neutral glycoproteins from human meconiums with specificities of the ABO and Lewis system. *Biochem J* 153, 63-73

Cummings RD, Kornfeld S (1982) Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J Biol Chem* 257, 11230-4

Cummings RD, Kornfeld S (1984) The distribution of repeating [Gal β 1,4GlcNAc β 1,3] sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHA $\text{\textcircled{2}}$.1. *J Biol Chem* 259, 6253-60

Cummings RD (1992) Synthesis of asparagine-linked oligosaccharides: pathways, genetics, and metabolic regulation. In *Glycoconjugates: composition, structure, and function* (Allen HJ and Kisailus EC, eds). Marcel Dekker Inc, New York, 333-60

D

Dabrowski J, Hanfland P, Egge H (1992) Analysis of glycosphingolipids by high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. In *Methods in Enzymology: complex carbohydrates* (Ginsburg V, ed). Academic Press, San Diego, vol 83, 69-86

Dahr W, Uhlenbruck G, Bird WG (1974) Cryptic A-like receptor sites in human erythrocyte glycoproteins: proposed nature of Tn antigen. *Vox Sang* 27, 29-42

Debray H, Qin Z, Delannoy P, Montreuil J, Dus D, Radzikowski C, Christensen B, Kieler J (1986) Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines. *Int J Cancer* 37, 607-11

Del Villano BC, Zurawski VR (1983) The carbohydrate antigenic determinant 19-9 (CA 19-9), a monoclonal antibody defined tumor marker. In *Immunodiagnosics*. Alan R. Liss Eds, New York, 269-82

Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS (1987) β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236, 582-5

Dennis JW (1992) Changes in glycosylation associated with malignant transformation and tumor progression. In *Cell surface carbohydrates and cell development* (Fukuda M, ed). CRC Press, London, 161-94

Dippold WG, Lloyd KO, Li LTC, Ikeda H, Oettgen HF, Old LJ (1980) Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 6114-8

F

Feizi T (1980) Structural and biological aspects of blood group I and i antigens on glycolipids and glycoproteins. *Blood transfusion and immunohaematology* 23, 563-77

Fernandes B, Sagman U, Auger M, Demetrio M, Dennis JW (1991) β 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res* 51, 718-23

Finne J (1982) Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 257, 11966-70

Finne J, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Leffler H, Vliegenthart JFG, Van Halbeek H (1989) Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelia cells. *J Biol Chem* 264, 5720-35

Fraser D, Clamp JR (1975) The glycoprotein content of meconium. *Clin Chim Acta* 59, 301-7

Fredman P, Von Holst H, Collins VP, Granholm L, Svennerholm L (1988) Sialyllactotetraosylceramide, a ganglioside marker for human malignant glioma. *J Neurochem* 50, 912-9

Fredman P, Månsson JE, Wikstrand CJ, Vrionis FD, Rynmark BM, Bigner DD, Svennerholm L (1989a) A new ganglioside of the lactotetraose series, GalNAc-3'-isoLM₁, detected in human meconium. *J Biol Chem* 264, 12122-5

Fredman P (1989b) Gangliosides of human gliomas *in vivo* and *in vitro*. In *Gangliosides and cancer* (Oettgen HF, ed). Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 109-16

Fukuda M, Dell A, Oates JE, Fukuda MN (1984a) Structure of branched lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes. *J Biol Chem* 259, 8260-73

Fukuda M, Spooner E, Oates JE, Dell A, Klock JC (1984b) Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J Biol Chem* 259, 10925-35

Fukuda M, Carlsson SR, Klock JC, Dell A (1986) Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 261, 12796-806

Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Fukuda M (1985) Embryonal lactosaminoglycan. *J Biol Chem* 260, 6623-31

Fukuda MN, Bothner B, Lloyd KO, Rettig WJ, Tiller PR, Dell A (1986) Structures of glycosphingolipids isolated from human embryonal carcinoma cells. The presence of mono- and disialosyl glycolipids with blood group type 1 sequence. *J Biol Chem* 261, 5145-53

Fukushi Y, Hakomori S, Nudelman E, Cochran N (1984a) Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. II. Selective isolation of hybridoma antibodies that differentially recognize mono-, di-, and trifucosylated type 2 chain. *J Biol Chem* 259, 4681-5

Fukushi Y, Nudelman E, Levery SB, Hakomori S, Rauvala H (1984b) Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. III. A hybridoma antibody FH6 defining a human cancer-associated difucoganglioside (VI³NeuAcV³III³Fuc₂NLc₆). *J Biol Chem* 259, 10511-7

Fukushi Y, Nudelman E, Levery SB, Higuchi T, Hakomori S (1986) A novel disialoganglioside (IV³NeuAcIII⁶NeuAcLc₄) of human adenocarcinoma and the monoclonal antibody (FH9) defining this disialosyl structure. *Biochemistry* 25, 2859-66

Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI, Wakisaka A, Togashi H, Chia D, Suyama N, Fukushi Y, Nudelman E, Hakomori S (1984) Characterization of sialylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res* 44, 5279-85

Fung PYS, Madej M, Koganty RR, Longenecker BM (1990) Active specific immunotherapy of a murine mammary adenocarcinoma using a synthetic tumor-associated glycoconjugate. *Cancer Res* 50, 4308-14



Gold P, Freedman SO (1965) Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 121, 439-62

Gooi HC, Feizi T, Kapadia A, Knowles BB, Solter D, Evans MJ (1981) Stage-specific embryonic antigen involves α 1-3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292, 156-8

Gottfries J, Fredman P, Månsson JE, Collins VP, Von Holst H, Armstrong DD, Percy AK, Wikstrand C, Bigner DD, Svennerholm L (1990) Determination of gangliosides in six human primary medulloblastomas. *J Neurochem* 55, 1322-6

Graham HA, Hirsch HF, Davies DM (1977) In *Human blood groups Proc. 5th Int. Convocation on immunology, Buffalo, New-York 1976* (Mohn JF et al, eds). Karger, Basel, 257-67



Hakomori S, Jeanloz RW (1964) Isolation of glycolipid containing fucose, galactose, glucose, and glucosamine from human cancerous tissue. *J Biol Chem* 239, 3606-7

Hakomori S, Andrews H (1970) Sphingoglycolipids with Le^b activity, and the co-presence of Le^a-, Le^b-glycolipids in human tumor tissue. *Biochim Biophys Acta* 202, 225-8

Hakomori S, Siddiqui B, Li Y, Li S, Hellerqvist CG (1971) Anomeric structures of globoside and ceramide trihexoside of human erythrocytes and hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 246, 2271-7

Hakomori S, Kobata A (1974) Blood group antigens. In *The antigens* (Sela M, ed). Academic Press, New York, vol II, 79-140

Hakomori S, Wang SM, Young WWJr (1977) Isoantigenic expression of Forssman glycolipid in human gastric and colonic mucosa: its possible identity with "A-like antigen" in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3023-7

Hakomori S, Nudelman E, Lavery SB, Solter D, Knowles BB (1981) The hapten structure of a developmentally regulated glycolipid antigen (SSEA-1) isolated from human erythrocytes and adenocarcinoma: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 100, 1578-86

Hakomori S, Nudelman E, Kannagi R, Lavery SB (1982) The common structure in fucosyllactosaminolipids accumulating in human adenocarcinomas, and its possible absence in normal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 109, 36-44

Hakomori S, Nudelman E, Lavery SB, Patterson CM (1983a) Human cancer-associated gangliosides defined by a monoclonal antibody (1B9) directed to sialosyl α 2-6 galactosyl residue: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 791-8

Hakomori S, Young WWJr (1983b) Glycolipid antigens and genetic markers. In *Handbook of lipid research* (Kanfer JN and Hakomori S, eds). Plenum Press, New York and London, vol 3, 381-436

Hakomori S, Patterson CM, Nudelman E, Sekiguchi K (1983c) A monoclonal antibody directed to N-acetylneuraminosyl- α 2 \rightarrow 6-galactosyl residue in gangliosides and glycoproteins. *J Biol Chem* 258, 11819-22

Hakomori S, Nudelman E, Lavery SB, Kannagi R (1984) Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. I. Glycolipids with di- or trifucosylated type 2 chain. *J Biol Chem* 259, 4672-80

Hakomori S (1985) Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 45, 2405-14

Hakomori S (1989) Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 52, 257-331

Hakomori S (1991) New directions in cancer therapy based on aberrant expression of glycosphingolipids: anti-adhesion and ortho-signaling therapy. *Cancer cells* 3, 461-70

Hakomori S (1992) Tumor-associated carbohydrate markers. In *Serological cancer markers* (Sell S, ed). The Humana Press, Totowa, 207-32

Hammarström S, Hammarström M, Sundblad JA, Lönnngren J (1982) Mitogenic leukoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 1611-5

Handa S, Burton RM (1969) Biosynthesis of glycolipids: incorporation of N-acetylgalactosamine by a rat brain particulate preparation. *Lipids* 4, 589-98

Hanisch FG, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski J, Dabrowski U (1989) Structures of neutral O-linked poly(lactosamine) glycans on human skim milk mucins. *J Biol Chem* 264, 872-83

Hanisch FG, Hanski C, Hasegawa A (1992) Sialyl Lewis^x antigen as defined by monoclonal antibody AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Res* 52, 3138-44

Hanski C, Bornhoeft G, Topf N, Hermann U, Stein H, Riecken EO (1990) Detection of a mucin marker for the adenoma-carcinoma sequence in human colonic mucosa by monoclonal antibody AM-3. *J Clin Pathol* 43, 379-85

Hanson GC, Zopf D (1985) Biosynthesis of the cancer-associated sialyl-Le^a antigen. *J Biol Chem* 260, 9388-92

Harries JT (1978) Meconium in health and disease. *Br Med Bull* 34, 75-8

Hellström I, Brankovan V, Hellström KE (1985) Strong antitumor activities of IgG3 antibodies to a human melanoma-associated ganglioside. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1499-502

Heiner JP, Miraldi F, Kallick S, Makley J, Neely J, Smith-Mensah WH, Cheung NV (1987) Localization of GD₂-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res* 47, 5377-81

Herlant-Peers M, Montreuil J, Strecker G, Dorland L, Van Halbeek H, Veldink GA, Vliegthart JFG (1981) Structures of fifteen oligosaccharides isolated from New-born meconium. *Eur J Biochem* 117, 291-300

Herlyn M, Sears HF, Steplewski Z, Koprowski H (1982) Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. Presence in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma. *J Clin Immunol* 2, 135-40

Higashi H, Nishi Y, Fukui Y, Ikuta K, Ueda S, Kato S, Fujita M, Nakano Y, Taguchi T, Sakai S, Sako M, Naiki M (1984) Tumor-associated expression of glycosphingolipid Hanganutziu-Deicher antigen in human cancers. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 75, 1025-9

Higashi H, Hirabayashi Y, Hirota M, Matsumoto M, Kato S (1987) Detection of ganglioside GM₂ in sera and tumor tissue of hepatoma patients. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78, 1309-13

Hirabayashi Y, Kasakura H, Matsumoto M, Higashi H, Kato S, Kasai N, Naiki M (1987) Specific expression of unusual GM₂ ganglioside with Hanganutziu-Deicher antigen activity on human colon cancers. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78, 251-60

Hirohashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y (1985) Blood group A cross-reacting epitope by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7039-43

Hirohashi S, Clausen H, Nudelman E, Inoue H, Shimosato Y, Hakomori S (1986) A human monoclonal antibody directed to blood group i antigen: heterohybridoma between human lymphocytes from regional lymph nodes of a lung cancer patient and mouse myeloma. *J Immunol* 136, 4163-8

Hirota M, Fukushima K, Terasaki PI, Terashita GY, Kawahara M, Chia D, Suyama N, Togashi H (1985) Sialosylated Lewis^x in the sera of cancer patients detected by a cell-binding inhibition assay. *Cancer Res* 45, 1901-5

Hoff SD, Matsushita Y, Ota DM, Cleary KR, Yamori T, Hakomori S, Irimura T (1989) Increased expression of sialyl-dimeric Le^x antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 49, 6883-8

Holmes EH, Ostrander GK, Hakomori S (1985) Enzymatic basis for the accumulation of glycolipids with X and dimeric X determinants in human lung cancer cells (NCI-H69). *J Biol Chem* 260, 7619-27

Holmes EH, Ostrander GK, Hakomori S (1986) Biosynthesis of the sialyl-Le^x determinant carried by type 2 chain glycosphingolipids (IV³NeuAcIII³nLc₄, VI³NeuAcV³FucnLc₆, and VI³NeuAcIII³V³Fuc₂nLc₆) in human lung carcinoma PC9 cells. *J Biol Chem* 261, 3737-43

Holmes EH, Ostrander GK, Clausen H, Graem N (1987a) Oncofetal expression of Le^x carbohydrate antigens in human colonic adenocarcinomas. Regulation through type 2 core chain synthesis rather than fucosylation. *J Biol Chem* 262, 11331-8

Holmes EH, Hakomori S, Ostrander GK (1987b) Synthesis of type 1 and 2 lacto series glycolipid antigens in human colonic adenocarcinoma and derived cell lines is due to activation of a normally unexpressed $\beta 1 \rightarrow 3$ N-Acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 262, 15649-58

Holmgren J, Lindholm L, Persson B, Lagergard T, Nilsson O, Svennerholm L, Rudenstam CM, Unsgaard B, Yugvason F, Petterson S, Killander AF (1984) Detection by monoclonal antibody of carbohydrate antigen CA 50 in serum of patients with carcinoma. *Br Med J* 288, 1479-82

Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, Welt S, Fliegel B, Vadhan S, Carswell E, Melamed MR, Oettgen HF, Old LJ (1985) Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD₃ ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1242-6

Hounsell EF, Feizi T (1982) Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med Biol* 60, 227-36

Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Gooi HC, Pickering NJ, Stoll MS, Lui SC, Feizi T (1985) Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens. *Eur J Biochem* 148, 367-77

Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Cashmore GC, Kane DP, Stoll MS, Feizi T (1988) Identification of a novel oligosaccharide backbone structure with a galactose residue monosubstituted at C-6 in human foetal gastrointestinal mucins. *Biochem J* 256, 397-401

Hounsell EF, Lawson AM, Stoll MS, Kane DP, Cashmore GC, Carruthers RA, Feeney J, Feizi T (1989) Characterization by mass-spectrometry and 500-MHz proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of penta- and hexasaccharide chains of human foetal gastrointestinal mucins (meconium glycoproteins). *Eur J Biochem* 186, 597-610

Huang LC, Brockhaus M, Magnani JL, Cuttitta F, Rosen S, Minna JD, Ginsburg V (1983) Many monoclonal antibodies with an apparent specificity for certain lung cancers are directed against a sugar sequence found in Lacto-N-fucopentaose III. *Arch Biochem Biophys* 220, 318-20



Irie RF, Sze LL, Saxton RE (1982) Human antibody to OFA-I, a tumor antigen, produced *in vitro* by Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 5666-70

Irie RF, Morton DL (1986) Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 8694-8

Itai S, Arie S, Tobe T, Kitahara A, Kim YC, Yamabe H, Ohtsuki H, Kirihara Y, Shigeta K, Kannagi R (1988) Significance of 2-3 and 2-6 sialylation of Lewis a antigen in pancreas cancer. *Cancer* 61, 775-87

Itai S, Nishikata J, Yoneda T, Ohmori K, Yamabe H, Arie S, Tobe T, Kannagi R (1991) Tissue distribution of 2-3 and 2-6 sialyl Lewis a antigens and significance of the ratio of two antigens for the differential diagnosis of malignant and benign disorders of the digestive tract. *Cancer* 67, 1576-87

Ito H, Tashiro K, Stroud MR, Ørntoft TF, Meldgaard P, Singhal AK, Hakomori S (1992) Specificity and immunobiological properties of monoclonal antibody IMH2, established after

immunization with Le^b/Le^a glycosphingolipid, a novel extended type 1 chain antigen. *Cancer Res* 52, 3739-45

Itzkowitz SH, Yuan M, Fukushi Y, Palekar A, Phelps PC, Shamsuddin AM, Trump BF, Hakomori S, Kim YS (1986) Lewis^x-related and sialylated Lewis^x-related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res* 46, 2627-32

Itzkowitz SH, Yuan M, Fukushi Y, Lee H, Shi Z, Zurawski Jr V, Hakomori S, Kim YS (1988) Immunohistochemical comparison of Le^a, monosialosyl Le^a (CA 19-9), and disialosyl Le^a antigens in human colorectal and pancreatic tissues. *Cancer Res* 48, 3834-42

Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49, 197-204

Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS (1990) Sialosyl Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 66, 1960-6

Itzkowitz SH, Bloom EJ, Lau TS, Kim YS (1992) Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut* 33, 518-23

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1977) The nomenclature of lipids. Recommendations, 1976. *Eur J Biochem* 79, 11-21

Iwai K, Ishikura H, Kaji M, Sugiura H, Ishizu A, Takahashi C, Kato H, Tanabe T, Yoshiki T (1993) Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis^a in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer* 54, 972-7

K

Kaizu T, Levery SB, Nudelman E, Stenkamp RE, Hakomori S (1986) Novel fucolipids of human adenocarcinoma: monoclonal antibody specific for trifucosyl Le^y (III³FucV³FucVI²FucnLc₆) and a possible three-dimensional epitope structure. *J Biol Chem* 261, 11254-8

Kaneko T, Iba Y, Zenita K, Shigeta K, Nakamo K, Itoh W, Kurosawa Y, Kannagi R, Yasukawa K (1993) Preparation of mouse-monoclonal chimeric antibody to an embryonic carbohydrate antigen, Lewis Y. *J Biochem* 113, 114-7

Kannagi R, Lavery SB, Ishigami F, Hakomori S, Shevinsky LH, Knowles BB, Solter D (1983) New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3. *J Biol Chem* 258, 8934-42

Kannagi R, Lavery SB, Hakomori S (1984) Blood group H antigen with globo-series structure. Isolation and characterization from human blood group O erythrocytes. *FEBS Lett* 175, 397-401

Kannagi R, Fukushi Y, Tachikawa T, Noda A, Shin S, Shigeta K, Hiraiwai N, Fukuda Y, Inamoto T, Hakomori S, Imura H (1986) Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain polylectosamine. *Cancer Res* 46, 2619-26

Kannagi R, Kitahara A, Itai S, Zenita K, Shigeta K, Tachikawa T, Noda A, Hirano H, Abe M, Shin S, Fukushi Y, Hakomori S, Imura H (1988) Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing epitopes consisting of sialyl or sialyl-fucosyl type 1 chain. *Cancer Res* 48, 3856-63

Karlsson KA, Larson G (1978) Molecular characterization of cell surface antigens of human fetal tissue. Meconium, a rich source of epithelial blood-group glycolipids. *FEBS Lett* 87, 283-7

Karlsson KA, Larson G (1979) Structural characterization of lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid isolated from human meconium. *J Biol Chem* 254, 9311-6

Karlsson KA, Larson G (1981) Molecular characterization of cell surface antigens of fetal tissue. Detailed analysis of glycosphingolipids of meconium of a human O Le(a-b+) secretor. *J Biol Chem* 256, 3512-24

Karlsson KA (1987) Preparation of total non acid glycolipids for overlay analysis of receptors for bacteria and viruses and for other studies. In *Methods in enzymology: complex carbohydrates* (Ginsburg V, ed). Academic Press, Orlando, vol 138, part E, 212-20

Kievit J, Van De Velde CJM (1990) Utility and cost of carcinoembryonic antigen monitoring in colon cancer follow-up evaluation. *Cancer* 65, 2580-7

Kim YS, Yuan M, Itzkowitz SH, Sun Q, Kaizu T, Palekar A, Trump BF, Hakomori S (1986) Expression of Le^y and extended Le^y blood group-related antigens in human malignant, premalignant, and non malignant colonic tissues. *Cancer Res* 46, 5985-92

Kitagawa H, Nakada H, Numata Y, Kurosaka A, Fukui S, Funakoshi I, Kawasaki T, Yamashina I (1988) A monoclonal antibody that recognizes sialyl-Le^a oligosaccharide, but is distinct from NS 19-9 as to epitope recognition. *J Biochem* 104, 817-21

Kitagawa H, Nakada H, Fukui S, Kawasaki T, Yamashina I (1991) Characterization of mucin-type oligosaccharides with the sialyl-Le^a structure from human colorectal adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 1429-36

Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S (1988) Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2-6 α -N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn). *Cancer Res* 48, 2214-20

Klenk E (1935) Über die natur der phosphatide und anderer lipoide des gehirus und der leber bei der niermann-pickschen krankleit. *Z Phys Chem* 235, 24-36

Kniep B, Monner DA, Burnichter H, Diehl V, Mühlradt PF (1983) Gangliotriaosylceramide (asialo GM₂), a glycosphingolipid marker for cell lines derived from patients with Hodgkin's disease. *J Immunol* 131, 1591-4

Kobata A, Takasaki S (1992) Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates. In *Cell surface carbohydrates and cell development* (Fukuda M, ed). CRC Press, London, 1-24

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7

Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5, 957-72

Kościelak J, Miller-Podraza H, Krauze R, Piasek A (1976) Isolation and characterization of poly(glycosyl)ceramides (megaloglycolipids) with A, H and I blood-group activities. *Eur J Biochem* 71, 9-18

Krusius T, Finne J, Rauvala H (1978) The poly(glycosyl) chains of glycoproteins. Characterization of a novel type of glycoprotein saccharides from human erythrocyte membrane. *Eur J Biochem* 92, 289-300

Kundu SK, Samuelsson BE, Pascher I, Marcus DM (1983) New gangliosides from human erythrocytes. *J Biol Chem* 258, 13857-66

Kundu SK (1992) Glycolipids: structure, synthesis, functions. In *Glycoconjugates: composition, structure, and function* (Allen HJ and Kisailus EC, eds). Marcel Dekker Inc, New York, 203-62

Kurosaka A, Nakajima H, Funakoshi I, Matsuyama M, Nagayo T, Yamashina I (1983) Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *J Biol Chem* 258, 11594-8

Kurosaka A, Funakoshi I, Matsuyama M, Nagayo T, Yamashina I (1985) UDP-GalNAc:GalNAc-mucin α -N-acetylgalactosamine transferase activity in human intestinal cancerous tissues. *FEBS Lett* 190, 259-62

Kurosaka A, Kitagawa H, Fukui S, Numata Y, Nakada H, Funakoshi I, Kawasaki T, Ogawa T, Iijima H, Yamashina I (1988) A monoclonal antibody that recognizes a cluster of a disaccharide, NeuAc α 2-6GalNAc, in mucin-type glycoproteins. *J Biol Chem* 263, 8724-6

Kyogashima M, Mulshine J, Linnoila RI, Jensen S, Magnani JL, Nudelman E, Hakomori S, Ginsburg V (1989) Antibody 624H12, which detects lung cancer at early stages, recognizes a sugar sequence in the glycosphingolipid difucosylneolactonorhexaosylceramide (V³FucIII³FucnLc₆Cer). *Arch Biochem Biophys* 275, 309-14



Larson G (1986) Globoseries glycosphingolipids of human meconium. *Arch Biochem Biophys* 246, 531-45

Lawson AM, Hounsell EF, Stoll MS, Feeney J, Chai W, Rosankiewicz JR, Feizi T (1991) Characterization of minor tetra- to hepta-saccharides O-linked to human meconium glycoproteins by t.l.c-m.s. microsequencing of neoglycolipid derivatives in conjunction with conventional m.s. and ¹H-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr Res* 221, 191-208

Leoni F, Colnaghi MI, Canevari S, Ménard S, Colzani E, Facheris P, Figini M, Miotti S, Magnani JL (1992) Glycolipids carrying Le^y are preferentially expressed on small-cell lung cancer cells as detected by the monoclonal antibody MLuC1. *Int J Cancer* 51, 225-31

Levine JL, Beasley L, Stallcup WB (1984) The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the central nervous system. *J Neurosci* 4, 820-31

Lhermitte M, Rahmoune H, Lamblin G, Roussel P, Strang AM, Van Halbeek H (1991) Structures of neutral oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O,Le^{a+b-}) patient suffering from chronic bronchitis. *Glycobiology* 1, 277-93

Livingston PO (1988) Immunization with purified gangliosides. *J Cell Biochem* 12E, 123

Longee DC, Wikstrand CJ, Mansson JE, He X, Fuller GN, Bigner SH, Fredman P, Svennerholm L, Bigner DD (1991) Disialosylganglioside GD_2 in human neuroectodermal tumor cell lines and gliomas. *Neuropathologica* 82, 45-54

Longenecker BM, Williams DJ, MacLean GD, Selvarajs S, Suresh MR, Noujaim AA (1987) Monoclonal antibodies and synthetic tumor-associated glycoconjugates in the study of the expression of Thomsen-Friedenreich-like and Tn-like antigens on human cancers. *J Natl Cancer Inst* 78, 489-96

Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N (1975) The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250, 8518-23

Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM (1990) ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyl transferase cDNA. *Cell* 63, 475-84



Maar AMS, Donald ASR, Watkins WM, Morgan WTJ (1967) Molecular and genetic aspects of human blood group Le^b specificity. *Nature* 215, 1345-9

Magnani JL, Smith DF, Ginsburg V (1980) Detection of gangliosides that bind cholera toxin: direct binding of ^{125}I -labeled toxin to thin-layer chromatograms. *Anal Biochem* 109, 399-402

Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1982) A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated Lacto-N-fucopentaose II. *J Biol Chem* 257, 14365-9

Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1983) Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res* 43, 5489-92

Månsson JE, Fredman P, Nilsson O, Lindholm L, Holmgren J, Svennerholm L (1985) Chemical structure of carcinoma ganglioside antigens defined by monoclonal antibody C-50 and some allied gangliosides of human pancreatic adenocarcinoma. *Biochem Biophys Acta* 834, 110-7

Marcus D, Kundu SK, Suzuki A (1981) The P blood group system: recent program in immunochemistry and genetics. *Semin Hematol* 18, 63-71

Mårtensson S, Due C, Pålsson P, Nilsson B, Eriksson H, Zopf D, Olsson L, Lundblad A (1988) A carbohydrate epitope associated with human squamous lung cancer. *Cancer Res* 48, 2125-31

Matsusako T, Muramatsu H, Shirahama T, Muramatsu T, Ohi Y (1991) Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le^x antigen, is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1218-22

McGuire EJ, Roseman S (1967) Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin. *J Biol Chem* 242, 3745-55

McKibbin JM, Spencer WA, Smith EL, Månsson JE, Karlsson KA, Samuelsson BE, Li YT, Li SC (1982) Lewis blood group fucolipids and their isomers from human and canine intestine. *J Biol Chem* 257, 755-60

Ménard S, Tagliabue E, Canevari S, Fossati G, Colnaghi MI (1983) Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res* 43, 1295-1300

Miyake M, Zenita K, Tanaka O, Okada Y, Kannagi R (1988) Stage-specific expression of SSEA-1-related antigens in the developing lung of human embryos and its relation to the distribution of these antigens in lung cancers. *Cancer Res* 48, 7150-8

Montreuil J (1982) Glycoproteins. In *Comprehensive biochemistry* (Neuberger A and Van Deenen LLM, eds). Elsevier, Amsterdam, vol 19B, part II, 1-188

Myoga A, Taki T, Arai K, Sekiguchi K, Ikeda I, Kurata K, Matsumoto M (1988) Detection of patients with cancer by monoclonal antibody directed to lactoneotetraosylceramide (paragloboside). *Cancer Res* 48, 1512-6

N

Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Watanabe T, Sakamoto J, Takagi H (1993) Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer* 71, 3044-53

Natoli EJ, Livingston PO, Pukel CS, Lloyd KO, Wiegandt H, Szalay J, Oettgen HF, Old LJ (1986) A murine monoclonal antibody detecting N-acetyl- and N-glycolyl-GM₂: characterization of cell surface reactivity. *Cancer Res* 46, 4116-20

Nilsson O, Månsson JE, Tibblin E, Svennerholm L (1981) Gangliosides of human meconium - Detection of a possible fetal antigen. *FEBS Lett* 133, 197-200

Nilsson O, Månsson JE, Brezicka FT, Holmgren J, Lindholm L, Sörenson S, Yngvason F, Svennerholm L (1984) Fucosyl-GM₁- A ganglioside associated with small cell lung carcinomas. *Glycoconjugate J* 1, 43-9

Nilsson O, Lindholm L, Holmgren J, Svennerholm L (1985a) Monoclonal antibodies raised against NeuAc α 2-6neolactotetraosylceramide detect carcinoma-associated gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 885, 577-83

Nilsson O, Månsson JE, Lindholm L, Holmgren J, Svennerholm L (1985b) Sialosyllactotetraosyl ceramide, a novel ganglioside antigen detected in human carcinomas by a monoclonal antibody. *FEBS Lett* 182, 398-402

Nilsson O, Brezicka FT, Holmgren J, Sörenson S, Svennerholm L, Yngvason F, Lindholm L (1986) Detection of a ganglioside antigen associated with small cell lung carcinomas using monoclonal antibodies directed against Fucosyl-GM₁. *Cancer Res* 46, 1403-7

Nishiwaki S, Taki T, Handa N, Hattori N, Takeshita K, Endo M, Handa S (1992) Elevation of 4 β -galactosyltransferase activity for paragloboside synthesis in sera of patients with cancer. *Cancer Res* 52, 1875-80

Nores GA, Dohi T, Taniguchi M, Hakomori S (1987) Density-dependent recognition of cell surface GM₃ by a certain anti-melanoma antibody, and GM₃ lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J Immunology* 139, 3171-6

Nudelman E, Hakomori S, Kannagi R, Lavery S, Yeh MY, Hellström KE, Hellström I (1982) Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody, 4.2. *J Biol Chem* 257, 12752-6

Nudelman E, Kannagi R, Hakomori S, Parsons M, Lipinski M, Wiels J, Fellous M, Tursz T (1983) A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science* 220, 509-11

Nudelman E, Fukushi Y, Lavery S, Higuchi T, Hakomori S (1986a) Novel fucolipids of human adenocarcinoma: disialosyl Le^a antigen (III⁴Fuc III⁶NeuAc IV³NeuAc Lc₄) of human colonic adenocarcinoma and the monoclonal antibody (FH7) defining this structure. *J Biol Chem* 261, 5487-95

Nudelman E, Lavery SB, Kaizu T, Hakomori S (1986b) Novel fucolipids of human adenocarcinoma: characterization of the major Le^y antigen of human adenocarcinoma as trifucosylnonaosyl Le^y glycolipid (III³FucV³FucVI²FucnLc₆). *J Biol Chem* 261, 11247-53

Nudelman E, Lavery SB, Stroud MR, Salyan MEK, Abe K, Hakomori S (1988) A novel-tumor-associated, developmentally regulated glycolipid antigen defined by monoclonal antibody ACFH-18. *J Biol Chem* 263, 13942-51



Ogata S, Maimonis RJ, Itzkowitz SH (1992) Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 52, 4741-6

Ohmori K, Yoneda T, Shigeta K, Hirashima K, Kanai M, Itai S, Sasaoki T, Arai S, Arita M, Kannagi R (1989) Sialyl SSEA-1 antigen as a carbohydrate marker of human natural killer cells and immature lymphoid cells. *Blood* 74, 255-61

Ohyama C, Fukushi Y, Satoh S, Orikasa S, Nudelman E, Stroud M, Hakomori S (1990) Changes in glycolipid expression in human testicular tumor. *Int J Cancer* 45, 1040-4

Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R (1986) Genetics of ABO, H, Lewis X and related antigens. *Vox Sang* 51, 161-71

P

Painter TJ, Watkins WM, Morgan WTJ (1965) Serologically active fucose-containing oligosaccharides isolated from human blood group A and B substances. *Nature* 206, 594-7

Pettijohn DE, Stranahan PL, Due C, Rønne E, Sørensen HR, Olsson L (1987) Glycoproteins distinguishing non-small cell from small cell human lung carcinoma recognized by monoclonal antibody 43-9F. *Cancer Res* 47, 1161-9

Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC (1990) ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science* 250, 1130-2

Pierce M, Arango J (1986) 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. *J Biol Chem* 261, 10772-7

Pigman W, Gottschalk A (1966) Submaxillary gland glycoproteins. In *Glycoproteins* (Gottschalk A, ed). New York, 434-45

Piller F, Cartron JP, Maranduba A, Veyrieres A, Leroy Y, Fournet B (1984) Biosynthesis of blood group I antigens. *J Biol Chem* 259, 13385-90

Portoukalian J, Zwingelstein G, Abdul-Malak N, Doré JF (1978) Alteration of gangliosides in plasma and red cells of humans bearing melanoma tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 85, 916-20

Portoukalian J, Bouchon B (1986) Hydrolysis of all gangliosides, including GM₁ and GM₂, on thin-layer plates by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *J Chrom Biomed Applic* 128, 386-92

Portoukalian J, David MJ, Gain P, Richard M (1993) Shedding of GD₂ ganglioside in patients with retinoblastoma. *Int J Cancer* 53, 948-51

Prieto PA, Smith DF (1985) A new ganglioside in human meconium detected by antiserum against the human milk sialyloligosaccharide, LS-tetrasaccharide b. *Arch Biochem Biophys* 241, 281-9

Prieto PA, Smith DF (1986) A new ganglioside in human meconium detected with antiserum against human milk sialyltetrasaccharide a. *Arch Biochem Biophys* 249, 243-53

Pukel CS, Lloyd KO, Travassor R, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ (1982) GD₃, a prominent ganglioside of human melanoma. *J Exp Med* 155, 1133-47

R

Rana SS, Chandrasekaran EV, Kennedy J, Mendicino J (1984) Purification and structures of oligosaccharide chains in swine trachea and cowper's gland mucin glycoproteins. *J Biol Chem* 259, 12899-907

Ravindranath MH, Higa HH, Cooper EL, Paulson JC (1985) Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a murine crab *cancer antennarius*. *J Biol Chem* 260, 8850-6; Correction (1986) *J Biol Chem* 261, 1983

Ravindranath MH, Paulson JC, Irie RF (1988) Human melanoma antigen O-acetylated ganglioside GD₃ is recognized by *cancer antennarius* lectin. *J Biol Chem* 263, 2079-86

Ravindranath MH, Morton DL, Irie RF (1989) An epitope common to gangliosides O-acetyl-GD₃ and GD₃ recognized by antibodies in melanoma patients after active specific immunotherapy. *Cancer Res* 49, 3891-7

Ravindranath MH, Tsuchida T, Morton DL, Irie RF (1991) Ganglioside GM₃:GD₃ ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer* 67, 3029-35

Rege VP, Painter TJ, Watkins WM, Morgan WTJ (1964a) Isolation of serologically active fucose-containing oligosaccharides from human blood group H substance. *Nature* 203, 360-3

Rege VP, Painter TJ, Watkins WM, Morgan WTJ (1964b) Isolation of serologically active fucose-containing trisaccharide from human blood group Le^a substance. *Nature* 204, 740-2

Rovis L, Anderson B, Kabat EA, Gruezo F, Liao J (1973) Structures of oligosaccharides produced by base-borohydride degradation of human ovarian cyst blood group H, Le^b and Le^a active glycoproteins. *Biochemistry* 12, 5340-54



S

Sadler EJ, Rearick JI, Hill RL (1979) Purification to homogeneity and enzymatic characterization of an α -N-acetylgalactosaminide α 2-6sialyltransferase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem* 254, 5934-41

Schachter H, Williams D (1982) Biosynthesis of mucus glycoproteins. In *Mucus health and disease* (Chantler EN, Elder JB and Elstein M, eds). Plenum press, New York, vol 2, 3-28

Schachter H (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 64, 163-81

Schachter H, Brockhausen I (1992) The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugates: composition, structure, and function* (Allen HJ and Kisailus EC, eds). Marcel Dekker Inc, New York, 263-332

Schrump DS, Furukawa K, Yamaguchi H, Lloyd KO, Old LJ (1988) Recognition of galactosylgloboside by monoclonal antibodies derived from patients with primary lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4441-5

Schulz G, Cheresh DA, Varki NM, Yu A, Staffileno LK, Reisfeld RA (1984) Detection of ganglioside GD₂ in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res* 44, 5914-20

Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I, Solter D (1982) Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell* 30, 697-705

Shitara K, Hanai N, Kusano A, Furuya A, Yoshida H, Wada K, Watanabe T, Sato S (1991) Application of anti-sialyl Le^a monoclonal antibody, KM231, for immunotherapy of cancer. *Anticancer Res* 11, 2003-14

Shitara K, Kuwana Y, Nakamura K, Tokutake Y, Ohta S, Miyaji H, Hasegawa M, Hanai N (1993) A mouse/human chimeric anti-(ganglioside GD₃) antibody with enhanced antitumor activities. *Cancer Immunol Immunother* 36, 373-80

Siddiqui B, Hakomori S (1971) A revised structure for the forssman glycolipid hapten. *J Biol Chem* 246, 5766-9

Siddiqui B, Hakomori S (1973) A ceramide tetrasaccharide of human erythrocyte membrane reacting with anti-type XIV pneumococcal polysaccharide antiserum. *Biochem Biophys Acta* 330, 147-55

Siddiqui B, Buehler J, DeGregorio MW, Macher BA (1984) Differential expression of ganglioside GD₃ by human leukocytes and leukemia cells. *Cancer Res* 44, 5262-5

Singhal AK, Ørntoft TF, Nudelman E, Nance S, Schibig L, Stroud MR, Clausen H, Hakomori S (1990) Profiles of Lewis^x-containing glycoproteins and glycolipids in sera of patients with adenocarcinoma. *Cancer Res* 50, 1375-80

Singhal A, Fohn M, Hakomori S (1991) Induction of α -N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice. *Cancer Res* 51, 1406-11

Slomiany BL, Zdebska E, Slomiany A (1984) Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H⁺Le^{b+} gastric mucin. *J Biol Chem* 259, 2863-99

Solter D, Knowles BB (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 5565-9

Song Y, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y (1991) Isolation and structural elucidation of a novel type of ganglioside, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipid, from rainbow trout sperm. The first example of the natural occurrence of KDN-ganglioside, (KDN)GM₃. *J Biol Chem* 266, 21929-35

Song Y, Kitajima K, Inoue S, Muto Y, Kasama T, Handa S, Inoue Y (1993) Structure of novel gangliosides, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipids, isolated from rainbow trout ovarian fluid. *Biochemistry* 32, 9221-9

Springer GF (1984) T and Tn general carcinoma antigens. *Science* 224, 1198-206

Stroud MR, Lavery SB, Nudelman ED, Salyan MEK, Towell JA, Roberts CE, Watanabe M, Hakomori S (1991) Extended type-1 chain glycosphingolipids: dimeric Le^a (III⁴V⁴Fuc₂Lc₆) as human tumor-associated antigen. *J Biol Chem* 266, 8439-46

Stroud MR, Lavery SB, Salyan MEK, Roberts CE, Hakomori S (1992) Extended type-1 chain glycosphingolipid antigens. Isolation and characterization of trifucosyl-Le^b antigen (III⁴V⁴VI²Fuc₃Lc₆). *Eur J Biochem* 203, 577-86

Stults CLM, Sweeley CC, Macher BA (1989) Glycolipids: structure, biological source, and properties. In *Methods in enzymology: complex carbohydrates* (Ginsburg V, ed). Academic Press, San Diego, vol 179, part F, 167-214

Suzuki Y, Nishi H, Hidari K, Hirabayashi Y, Matsumoto M, Kobayashi T, Watarai S, Yasuda T, Nakayama J, Maeda H, Katsuyama T, Kanai M, Kiso M, Hasegawa A (1991) A new monoclonal antibody directed to sialyl α 2-3 lactoneotetraosylceramide and its application for detection of human gastrointestinal neoplasms. *J Biochem* 109, 354-60

Svennerholm L (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem* 10, 613-23

Svennerholm L, Fredman P (1980) A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 617, 97-109

Svennerholm L, Fredman P, Månsson JE, Nilsson O, Holmgren J (1982) Gangliosides of human intestinal mucosa: detection of a possible fetal antigen. *Adv Exp Med Biol* 152, 333-42

Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Månsson JE, Rosengren B, Rynmark BM (1989) Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta* 1005, 109-17



Tai T, Paulson JC, Cahan LD, Irie RF (1983) Ganglioside GM₂ as a human tumor antigen (OFA-I-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 5392-6

Tai T, Cahan LD, Tsuchida T, Morton DL, Irie RF (1985) Immunization of melanoma associated gangliosides in cancer patients. *Int J Cancer* 35, 607-12

Tai T, Kawashima I, Tada N, Dairiki K (1988) Different fine binding specificities of monoclonal antibodies to disialosylganglioside GD₂. *J Biochem* 103, 682-7

Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R (1991) Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis^x. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 713-9

Takahashi HK, Metoki R, Hakomori S (1988) Immunoglobulin G3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor-associated α -N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen. *Cancer Res* 48, 4361-7

Taki T, Ishikawa H, Imai K, Yachi A, Matsumoto M (1985) Immunological analysis of glycolipids on cell surfaces of cultured human tumor cell lines: expression of lactoneotetraosylceramide on tumor cell surfaces. *J Biochem* 98, 887-95

Taki T, Takamatsu M, Myoga A, Tanaka K, Ando S, Matsumoto M (1988) Glycolipids of metastatic tissue in liver from colon cancer: appearance of sialylated Le^x and Le^x lipids. *J Biochem* 103, 998-1003

Taki T, Yamamoto K, Takamatsu M, Ishii K, Myoga A, Sekiguchi K, Ikeda I, Kurata K, Nakayama J, Handa S, Matsumoto M (1990) Accumulation of gangliosides with N-Acetylneuraminyl(α 2-6)lactosamine structure in primary human hepatoma. *Cancer Res* 50, 1284-90

Taki T, Rokukawa C, Kasama T, Kon K, Ando S, Abe T, Handa S (1992a) Human meconium gangliosides. Characterization of a novel I-type ganglioside with the NeuAc α 2-6Gal structure. *J Biol Chem* 267, 11811-7

Taki T, Rokukawa C, Kasama T, Handa S (1992b) Human hepatoma gangliosides: occurrence of a novel I-type glycolipid with NeuAc α 2-6Gal structure. *Cancer Res* 52, 4805-11

Taniguchi N, Yokosawa N, Narita J, Mitsuyama T, Makita A (1981) Expression of Forssman antigen synthesis and degradation in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 67, 577-83

Tarrago MT, Tucker KH, Van Halbeek H, Smith DF (1988) A novel sialylhexasaccharide from human milk: purification by affinity chromatography on immobilized wheat germ agglutinin. *Arch Biochem Biophys* 267, 353-62

Tauchi K, Kakuda K, Machimura T, Makuuchi H, Mitomi T (1991) Immunohistochemical studies of blood group-related antigens in human superficial oesophageal carcinomas. *Cancer* 67, 3042-50

Tempero MA, Uchida E, Takasaki H, Burnett DA, Steplewski Z, Pour PM (1987) Relationship of carbohydrate antigen CA 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Cancer Res* 47, 5501-3

Thor A, Ohuchi N, Szpak CA, Johnston WW, Schlom J (1986) Distribution of oncofoetal antigen tumor-associated glycoprotein 72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res* 46, 3118-24

Thurin J, Herlyn M, Hindsgaul O, Strömberg N, Karlsson KA, Elder D, Steplewski Z, Koprowski H (1985) Proton NMR and Fast-atom Bombardment mass spectrometry analysis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-acetyl-GD₃. *J Biol Chem* 260, 14556-63

Tollefsen SE, Kornfeld R (1983) The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *J Biol Chem* 258, 5172-6

Troy FA (1992) Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* 2, 5-23

Tsuchida T, Saxton RE, Morton DL, Irie RF (1987) Gangliosides of human melanoma. *J Natl Cancer Inst* 78, 45-54

U

Urdal DL, Hakomori S (1983) Characterization of tumor-associated ganglio-N-triaosylceramide in mouse lymphoma and the dependency of its exposure and antigenicity on the sialosyl residues of a second glycoconjugate. *J Biol Chem* 258, 6869-74

V

Van Den Eijnden DH, Koenderman AHL, Schiphorst WECM (1988) Biosynthesis of blood group i-active polylactosaminoglycans. Partial purification and properties of an UDP-GlcNAc: N-Acetyllactosaminide β 1 \rightarrow 3-N-Acetylglucosaminyltransferase from Novikoff tumor cell ascites fluid. *J Biol Chem* 263, 12461-71

Van Echten G, Sandhoff K (1993) Ganglioside metabolism. *J Biol Chem* 268, 5341-4

Vangsted AJ, Clausen H, Kjeldsen TB, White T, Sweeney B, Hakomori S, Drivsholm L, Zeuthen J (1991) Immunochemical detection of a small cell lung cancer-associated ganglioside (FucGM₁) antigen in serum. *Cancer Res* 51, 2879-84

W

Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B (1990) Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250, 1132-5

Warren L, Fuhrer JP, Buck CA (1972) Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 1838-42

Warren L, Buck CA, Tuszynski GP (1978) Glycopeptide changes and malignant transformation a possible role for carbohydrate in malignant behavior. *Biochim Biophys Acta* 516, 97-127

Watanabe K, Hakomori S (1976a) Status of blood group carbohydrate chains in ontogenesis and its oncogenesis. *J Exp Med* 144, 645-53

Watanabe K, Matsubara T, Hakomori S (1976b) α -L-fucopyranosylceramide, a novel glycolipid accumulated in some of the human colon tumors. *J Biol Chem* 251, 2385-7

Watanabe K, Powell ME, Hakomori S (1979) Isolation and characterization of gangliosides with new sialyl linkage and core structures. II. Gangliosides of human erythrocyte membranes. *J Biol Chem* 254, 8223-9

Watanabe K, Arao Y (1981) A new solvent system for the separation of neutral glycosphingolipids. *J Lipid Res* 22, 1020-4

Watanabe M, Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Yamada T, Teshima S, Sekine T, Abe O (1985) Carbohydrate antigen defined by a monoclonal antibody raised against a gastric cancer xenograft. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 76, 43-52

Watanabe M, Ohishi T, Kuzuoka M, Nudelman ED, Stroud MR, Kubota T, Kodaira S, Abe O, Hirohashi S, Shimosato Y, Hakomori S (1991) *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of murine monoclonal antibody NCC-ST-421 reacting with dimeric Le^a (Le^a/Le^a) epitope. *Cancer Res* 51, 2199-204

Watarai S, Onuma M, Yasuda T (1991) Production of monoclonal antibodies specific for ganglioside GD₃. *J Biochem* 110, 889-95

Watkins WM (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood-group systems. In *Advances in human genetics* (Harris H and Hirschom K, eds). Plenum Publishing Co, New-York, vol 10, 1-136 and 379-85

Wiels J, Fellous M, Tursz T (1981) Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6485-8

Wikstrand CJ, He X, Fuller GN, Bigner SH, Fredman P, Svennerholm L, Bigner DD (1991) Occurrence of lacto series gangliosides 3'-iso LM1 and 3',6'-iso LD1 in human gliomas *in vitro* and *in vivo*. *J Neuropath Exp Neurol* 50, 756-69

Williams MA, McCluer RH (1980) The use of Sep-Pak C₁₈ cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem* 35, 266-9



Yamashita K, Tachibana Y, Ohkura T, Kobata A (1985) Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J Biol Chem* 260, 3963-9

Yamashita K, Totani K, Kuroki M, Matsuoka Y, Ueda I, Kobata A (1987) Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res* 47, 3451-9

Yamashita K, Totani K, Iwaki Y, Kuroki M, Matsuoka Y, Endo T, Kobata A (1989) Carbohydrate structures of nonspecific cross-reacting antigen-2, a glycoprotein purified from meconium as an antigen cross-reacting with anticarcinoembryonic antigen antibody. *J Biol Chem* 264, 17873-81

Yang HJ, Hakomori S (1971) A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-N-fucopentaose III. *J Biol Chem* 246, 1192-200

Yazawa S, Abbas SA, Madiyalakan R, Barlow JJ, Matta KL (1986) N-acetyl- β -D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarian tissue. *Carbohydr Res* 149, 241-52

Ye JN, Gu T, Xia L, Murphy MJ, Lee W, Gao N, Gu J, Fuhrer JP (1990) Enhanced expression of ganglioside GD₃ in human and rat hepatocellular carcinoma cells and NIH 3T3 cells transfected with human tumor DNAs. *Cancer Res* 50, 7697-702

Yeh MY, Hellström I, Abe K, Hakomori S, Hellström KE (1982) A cell-surface antigen which is present in the gangliosides fraction and shared by human melanoma. *Int J Cancer* 29, 269-25

Yoda Y, Ishibashi T, Makita A (1980) Isolation, characterization, and biosynthesis of Forssman antigen in human lung and lung carcinoma. *J Biochem* 88, 1887-90

Yonezawa S, Tachikawa T, Shin S, Sato E (1992) SialosylTn. Its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas. *Am J Clin Path* 98, 167-74

Yoshino T, Watanabe K, Hakomori S (1982) Chemical synthesis of α -L-fucopyranosylceramide and its analogues and preparation of antibodies directed to this glycolipid. *Biochemistry* 21, 928-34

Young WWJr, Mac Donald EMS, Nowinski RC, Hakomori S (1979) Production of monoclonal antibodies specific for two distinct steric portions of glycolipid ganglio-N-triaosylceramide (asialo GM₂). *J Exp Med* 150, 1008-19

Young WWJr, Johnson HS, Tamura Y, Karlsson KA, Larson G, Parker JMR, Khare DP, Spohr U, Baker DA, Hindsgaul O, Lemieux RU (1983) Characterization of monoclonal antibodies specific for the Lewis a human blood group determinant. *J Biol Chem* 258, 4890-4

Yuan M, Itzkowitz SH, Boland CR, Kim YD, Tomita JT, Palekar A, Bennington JL, Trump BF, Kim YS (1986) Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res* 46, 4841-7

Z

Zenita K, Kiriara Y, Kitahara A, Shigeta K, Higuchi K, Hirashima K, Murachi T, Miyake M, Takeda T, Kannagi R (1988) Fucosylated type-2 chain polylectosamine antigens in human lung cancer. *Int J Cancer* 41, 344-9

